

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-084

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 03-10-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2		VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR
1-10-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot			

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:

" Folate as a direct cofactor of eNOS in the different forms of pressure-overload induced heart failure "

Startdatum	01/11/2011	einddatum 9	01/12/2013
------------	------------	-------------	------------

Duur van de proef¹⁰: de langste duur een dier in experiment is 13wk (1wk pretreatment + 12 wks pressure-overload = 13wks).

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. g /afdeling
Verantwoordelijk onderzoeker (VO)			Art.9	
Vervanger VO (VVO)			Art.9	
Overige uitvoerenden			Art 12	
Overige uitvoerenden			Art.9	
Overige uitvoerenden			Art 12	
WB/punt 6				

Diergroep	1	2	3	4
	1a-1c	2a-2c	3a-3c	4a-4c
trl/exp/sham	Exp (TAC)	Exp (TAC)	Exp (TAC)	Exp (TAC)
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) *	Charles River	Charles River	Charles River	Charles River
Aantal	22	22	22	22
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 *	04	04	04	04
Pijnbestrijding *	04	04	04	04
Mate ongerief *	05	05	05	05
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

* VHL-coderingen zie bijlage

Diergroep	5	6	7	8	9	
ctrl/exp/sham	sham (TAC)	sham (TAC)	sham (TAC)	sham (TAC)	TAC no THF	
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	6	6	6	6	8	
Geslacht	M	M	M	M	M	
Dieren immuuncompetent ?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
Leeftijd/gewicht	age 9-11 wk, 21-24 g body wt	age 9-11 wk, 21-24 g body wt	age 9-11 wk, 21-24 g body wt	age 9-11 wk, 21-24 g body wt	age 9-11 wk, 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	

1 Verantwoording

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

Titel: "Folate as a direct cofactor of eNOS in the different forms of pressure-overload induced heart failure"

1. Doel van de proef.

Objectives:

Primary endpoint: Can R-THF and/or L- THF prevent or reverse eNOS-uncoupling in the different forms of pressure-overload induced remodeling (compensated heart failure)?

Secondary endpoint: Can R-THF and/or L- THF reduce NOS-uncoupling dependent superoxide generation, restore BH4-levels and increase NOS-activity?

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. We recently demonstrated that folic acid can reduce pressure-overload induced heart failure. However, we do have no idea how and when which form (L or R) of FA directly interferes as a direct eNOS cofactor.

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 role of eNOS-uncoupling. There are no alternatives for the use of mice in this project regarding eNOS-uncoupling and heart failure.

Because nobody can on a consecutive way uncouple eNOS in a test tube and because the exact sources of superoxide that creates eNOS uncoupling are not known in vivo, we can not perform these experiments in vitro.

4. Ethische afweging

Heart failure is a terminal heart disease. There are almost no therapeutic options to reverse pre-existing heart failure. We recently demonstrated that re-coupling of eNOS does have a role in the reversing process and demonstrated that folic acid prevents eNOS-uncoupling, however the mechanism of action remains unsolved. The use of mice, the indicated numbers and the expected mortality are justified.

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 (BH4, 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. In the vasculature, folic acid (FA, vitamin B9) can increase BH4-bioavailability by promoting the conversion of the inactive form BH2 towards BH4. GTPCH, the rate-limiting enzyme of BH4, is expressed in both endothelial cells (EC) and myocytes and is inhibited by caveolin-1.

Uncoupling of eNOS likely represents an important cellular defect involving both myocytes and EC, therefore, modulating eNOS becomes an attractive target to restore both myocardial and endothelial dysfunction.

Objectives:

Primary endpoint: Can R-THF and/or L- THF prevent or reverse eNOS-uncoupling in the different forms of pressure-overload induced remodeling (compensated heart failure).

Secondary endpoint: Can R-THF and/or L- THF reduces NOS-uncoupling dependent superoxide generation, restore BH4-levels and increase NOS-activity

Explanation of the necessity of all groups:

R-THF and L-THF: the right and left-turning forms are needed to explore the interaction of each of this form with the binding place at eNOS. It is very likely that one of this forms will show no interaction. But als this 'negative' result is of great importance for this project.

Different time-points: Because the represents different profiles of pressure-overload induced heart failure: 1 week represent hypertrophy, 5 wks dilation without decompensation and 12 wks dilation with decompensation (the so-called end staged heart failure).

Different dosages: the role of folate in the cardiovascular world is controversial (some studies show beneficial effects, others show no effect), and this is likely dose-related i.e. probably beneficial effect have been missed by others due to too low dosages. Therefore, we (i) would like to demonstrate a beneficial effect and (ii) shoe that this beneficial effect dose-dependent is.

Additional comments:

- Because of the high dosages, when extrapolating this mice dosage to humans, we can not simply say that this chronic treatment of folic acid is as safe as the low dosages used to treat hyperHcy, prevent neural tube defects etc. Therefore these experiments are necessary to know exactly which isoform we have to give afterwards to patients.

- We agree that when the difference among the isoforms is very clear, no further experiments will be needed with the non-active isoform. Therefore, the research will be done in steps i.e. 1 (and 5wks) experiments at the end.

So, in summary all groups are needed to explore our research questions

6. Wetenschappelijke beoordeling

- - has this DEC scientifically reviewed and agreed. Letter in 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

€

7b. Sexe

Male: Estrogens does have a cardioprotective effect in heart remodeling-studies. It is known (e.g. Koricanac et al. Eur. J Pharmacol 2011) that the estrogen signalling pathway interferes with cardiac eNOS. Therefore, we can not mix female and male results. We do realise that also investigation he female heart is important but this will be performed in a 2nd study by our collaborators at Charite university in Berlin.

7.c. Aantallen

Animals needed to explore:

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: $n = 2(z\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin $2(z\alpha/2 - z\pi)^2 = F$. Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (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 (d) wordt geschat op 0.25%.

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

Indien uitval 5 % (group 5,6,7 and 8).

$0.95 a = 5.652$

$a = 5.652/0.95$

$a = 5,949$

afgerond dus $n = 6$

Indien uitval 12.5% (group 1a-2a-3a-4a):

$0.875 a = 5.652$

$$a = 5.652/0.875$$

$$a = 6.459$$

afgerond dus $n = 7$

Indien uitval 15% (group 1b-2b-3b-4b)

$$0.85 a = 5.652$$

$$a = 5.652/0.85$$

$$a = 6.649$$

afgerond dus $n = 7$

Indien uitval 20% (group 1c-2c-3c-4c)

$$0.8 a = 5.652$$

$$a = 5.652/0.8$$

$$a = 7.065$$

afgerond dus $n = 8$

Indien uitval 25% (group 9)

$$0.75 a = 5.652$$

$$a = 5.652/0.75$$

$$a = 7.538$$

afgerond dus $n = 8$

Total $n = 112$

Overview:

Group	Subgroup	Description of groups	Estimated drop out%	Number of animal
1	1a	WT, TAC 1wk+ R-THF 0.025mg/kg/d from the beginning	12.5%	7
	1b	WT, TAC 3wk+ R-THF 0.025mg/kg/d from the beginning	15%	7
	1c	WT, TAC 12wk+ R-THF 0.025mg/kg/d from the beginning	20%	8
2	2a	TAC 1wk+ R-THF 0.25mg/kg/d from the beginning	12.5	7
	2b	TAC 3wk+ R-THF 0.25mg/kg/d from the beginning	15%	7
	2c	TAC 12wk+ R-THF 0.25mg/kg/d from the beginning	20%	8
3	3a	TAC 1wk+ L-THF 0.025mg/kg/d from the beginning	12.5%	7
	3c	TAC 3wk+ L-THF 0.025mg/kg/d from the beginning	15%	7
	3c	TAC 12wk+ L-THF 0.025mg/kg/d from the beginning	20%	8
4	4a	WT, TAC 1wk+ L-THF 0.25mg/kg/d from the beginning	12.5%	7
	4b	WT, TAC 3wk+ L-THF 0.25mg/kg/d from the beginning	15%	7
	4c	WT, TAC 12wk+ L-THF 0.25mg/kg/d from the beginning	20%	8
5	5	Sham + 0.025mg/kg R-THF	5%	6
6	6	Sham + 0.25mg/kg R-THF	5%	6
7	7	Sham + 0.025mg/kg L-THF	5%	6
8	8	Sham + 0.25mg/kg L-THF	5%	6
9	9	TAC, no THF	25%	8

Total : n = 120

Explanation of drop-outs:

TAC 1,5 and 12 wk; drop out resp. 12.5/15/20% due to mal-compensation to acute and afterwards pressure-overload (lung congestion). This has been reported at this institution in our previous TAC-DEC's

We do expect that in one of the 2 groups (R-THF vs. L-THF) the percentage due to drop-out will be significantly lower.

However, we do not know in which group, and it would be incorrect to guess on this. So, we preferred to keep the drop-out% unchanged, but will announce this later to the DEC.

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).

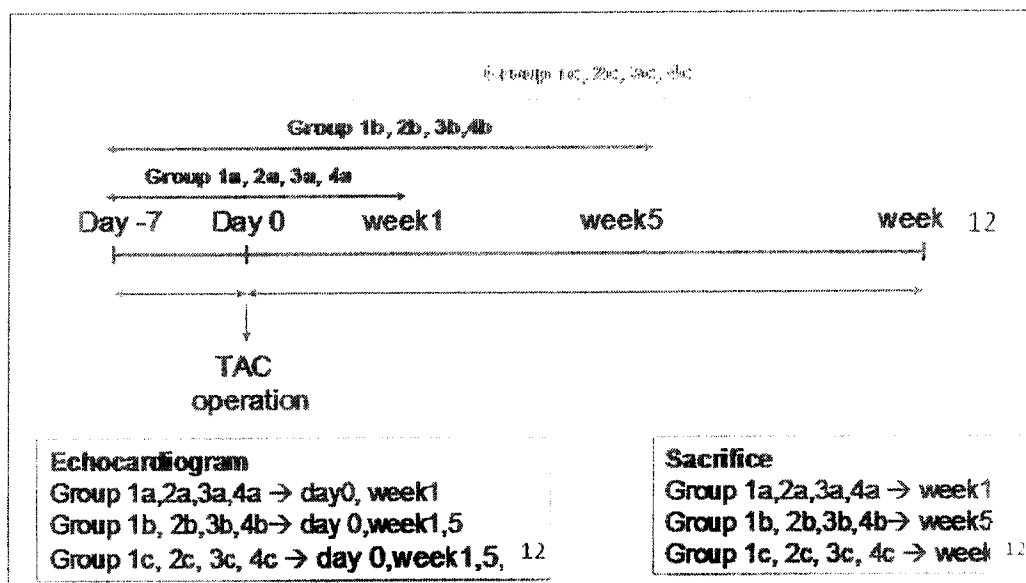
8. Experiment

Type of medication	Dose	Diergroep	Subgroup	Duration of TAC (wk)	Number of animals
R-tetrahydrofolate	0.025mg/kg/d	group 1	1a	1	7
			1b	5	7
			1c	12	8
	0.25 mg/kg/d	group 2	2a	1	7
			2b	5	7
			2c	12	8
L-tetrahydrofolate	0.025mg/kg/d	group 3	3a	1	7
			3b	5	7
			3c	12	8
	0.25 mg/kg/d	group 4	4a	1	7
			4b	5	7
			4c	12	8

Sham animals: group 5-6-7-8; 12 wk TAC, 6 animals/each group, 09-10/2012

Group 1 and 2 will be randomized and also group 3 and 4.

Experimental plan



Sham: group 5-6-7-8, 12wk

9. Experimentele condities

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%.

Due to the procedure (severe pressure-overload by transverse aortic constriction) and its acute reflection on the cardiovascular system, isoflurane is used as anaesthetic agent. Therefore, is part of a well-established SOP (see attachment) which is used in hundreds of mice at the laboratory of heart failure research of
ns and approved by See also our previous DEC 2010-008

For analysis of the heart function, we will use a short-axis evaluation. This is a very limited echocardiographic exam of 1 min max. 1 picture (of the short axis) is taken and is analysed afterwards. Because of the short duration (1 min max in experienced hands,) no anaesthesia is necessary. The mice is taken in one hands of an investigator (similar when you would place an i.p. injection) and one single image is taken.

9b. Pijnbestrijding

Morfine sc premedication + after surgery (0.2 mg /kg sc), 6x/d, 2d

Remark: We will give morfine as a premedication. The analgesia during the short operation-period (15 min) is covered with morfine and etomidate.

+3 as premedication. Afterwards, in the post-operative period we will give morfine (dosis 0.2 mg/kg) each 6h. We can not use NSAID, because NSAID interferes with endothelium-dependent vasodilation, which influences eNOS-biology and subsequently eNOS-uncoupling

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 defecits, 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.

In general, we do expect for this protocol sporadically SC edema, wound-problems, lack of appetite and lack of activity.

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 Bioserv (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 (5% or higher)..

Total: Score 05.

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

Aard van handeling	Ernst score ongerief	Duration	Frequentie
Pretreatment met medicatie welke geen gekende neveneffecten heeft (gemixed in voeding)	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
Injectie premedicatie, sc	2	10 sec	1x
Injectie pijnremming post-op	2	10 sec	6x/d
Ontwaken uit anesthesie na TAC-procedure	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 12 wk afh van groep). In de praktijk vnl in week 8-10	max 1x
Hair removal with 'veet' prior to short axis evaluation	2	3-5 min	Max 3x
Short Axis evaluation (this is not full echocardiography!)	3	3 min	Max 3x
Euthansia	2	3 min	1x

Remark: We do know from previous experiments that folates (in general) do have a beneficial effect on myocardial hypertrophy and dilation (DEC 2010- 008). This DEC is different in that way, that it deepens the mechanistics of it and focuses more on the role of THF as a new cofactor of NOS.

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

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 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

11. Verzorging en huisvesting

Regular housing CPV.

Transgenic dough diet, a complete diet, with R-THF or L-THF, 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)

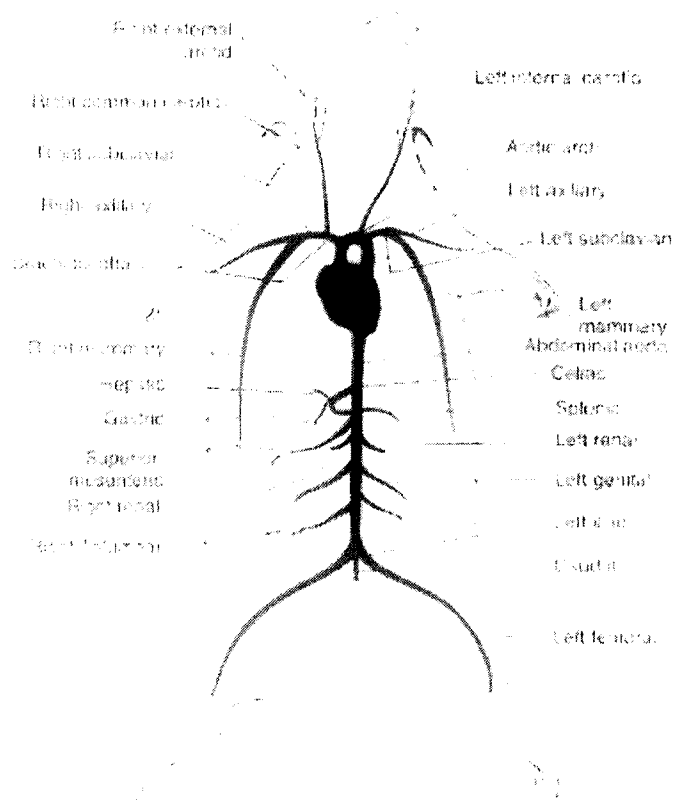
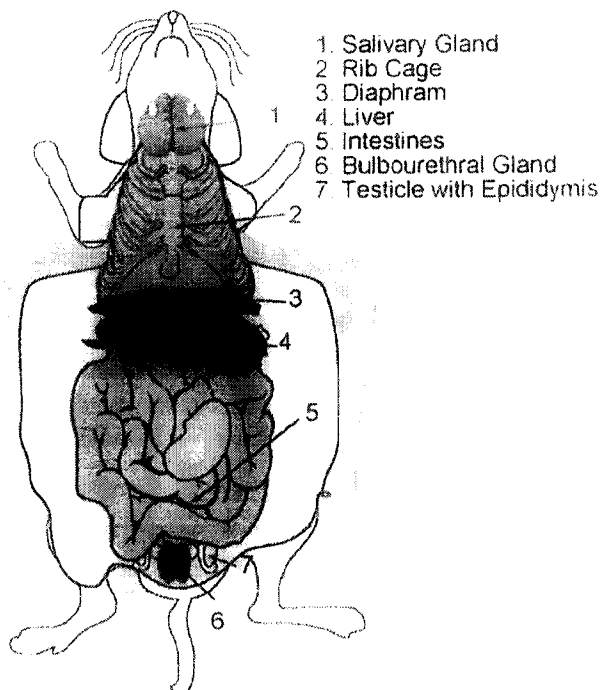
SOP:

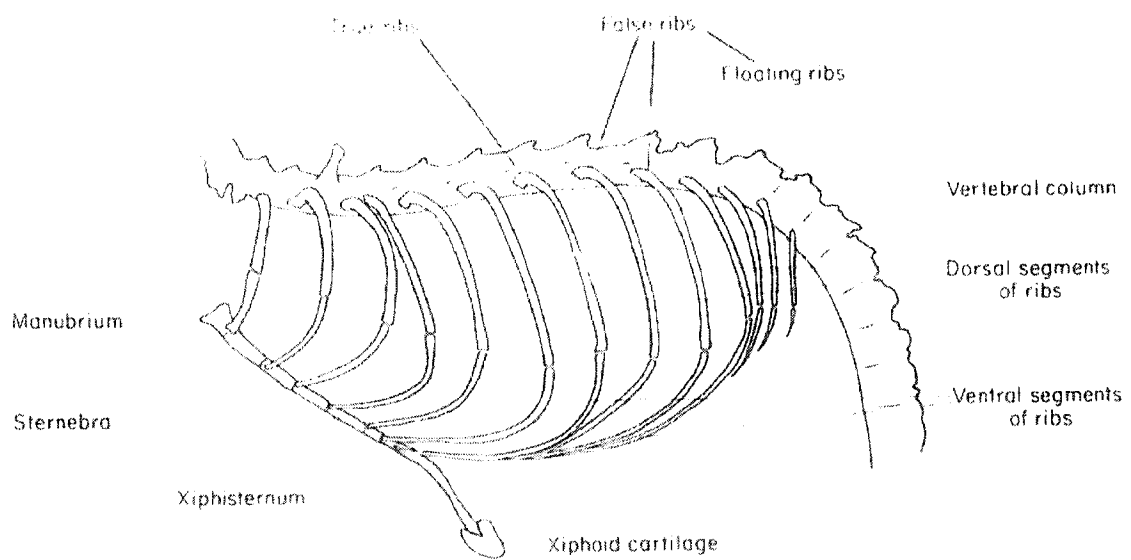
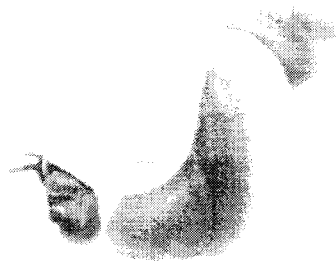
Relevante literatuur

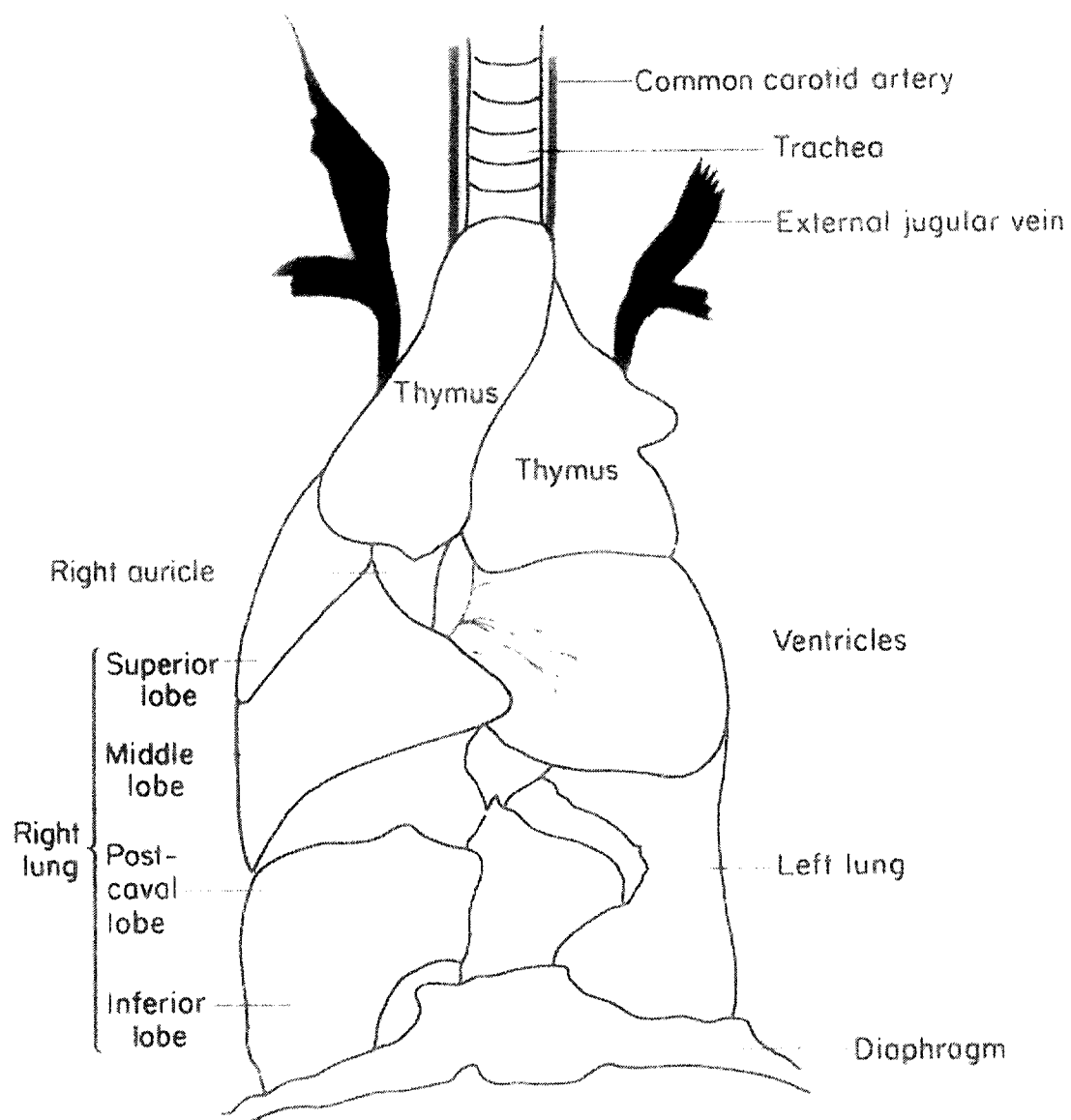
See attachment (Moens et al. 2008. and Reece et al. 2009)

SOP Transverse aortic surgery

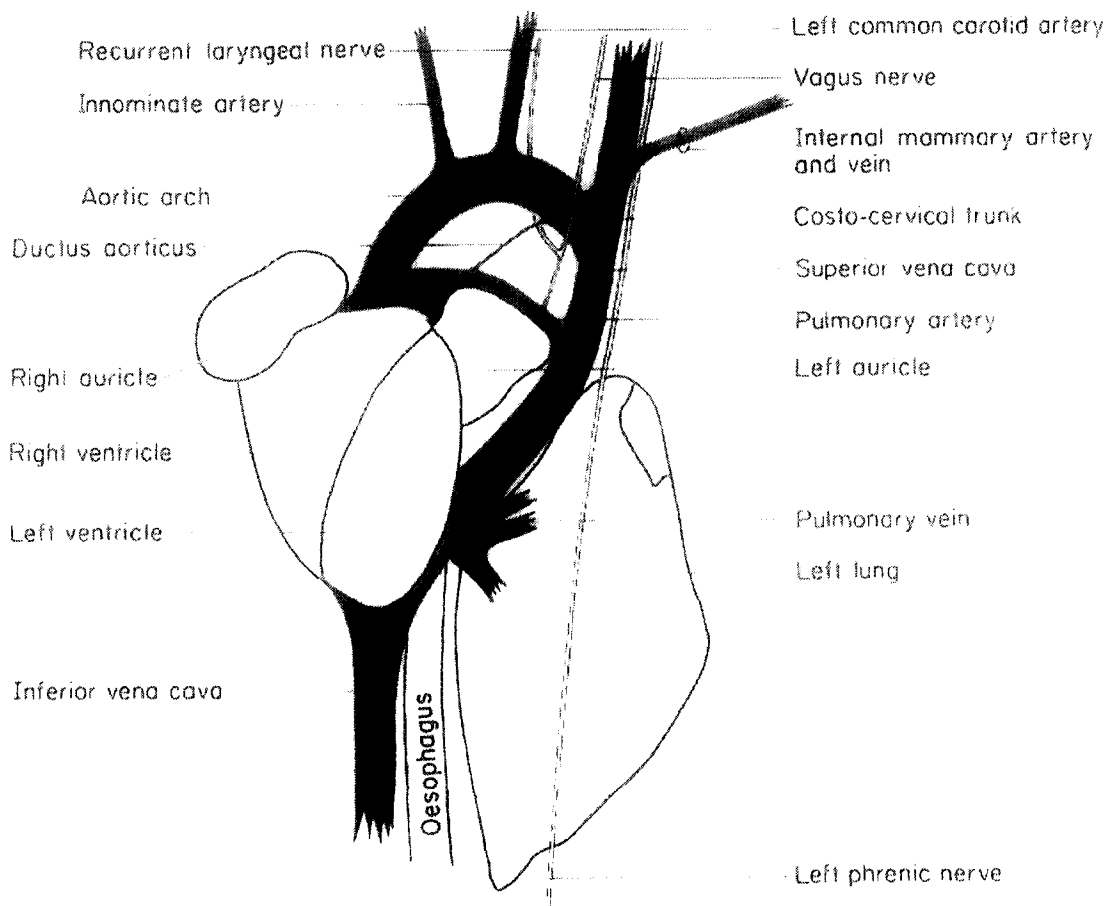
1. Mice (age 9-11wk, 21-24 g body wt) will be housed in an air-conditioned room with a 12:12-h light-dark cycle and fed standard mouse chow and tap water ad libitum, will undergo transverse aortic constriction (TAC) to produce pressure-load hypertrophy.
2. Anesthesia will be induced with isoflurane 5% (if needed add etomidate 0.8ml, i.p.) and after the intubation (16G plastic tube) maintained by 2% isoflurane gas in room air supplemented with 95% O₂/5% CO₂.
3. The mice will be placed on a volume ventilator (120 breaths/min, 1.2 ml/g/min).
4. The aortic arch will be isolated by entering the extrapleural space between the second and third rib, and afterwards the transverse aorta will be isolated between the right and left carotid arteries.
5. 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.
6. 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.
7. After removal of the air, the skin will be closed with 5-0 silk, and the animals will be extubated.
8. After subcutaneous injection of morphine sulphate 0.2 mg, the mice will be transferred back to their cages and a low dose of oxygen will be given.
9. Animal's respiratory and circulatory status will be checked every 30 minutes during the first 2 hours.
10. After checkup of the wound, animals are brought back to animal holding rooms on the day of following surgery.
11. Sham-operated mice will undergo the same operation except for aortic constriction.



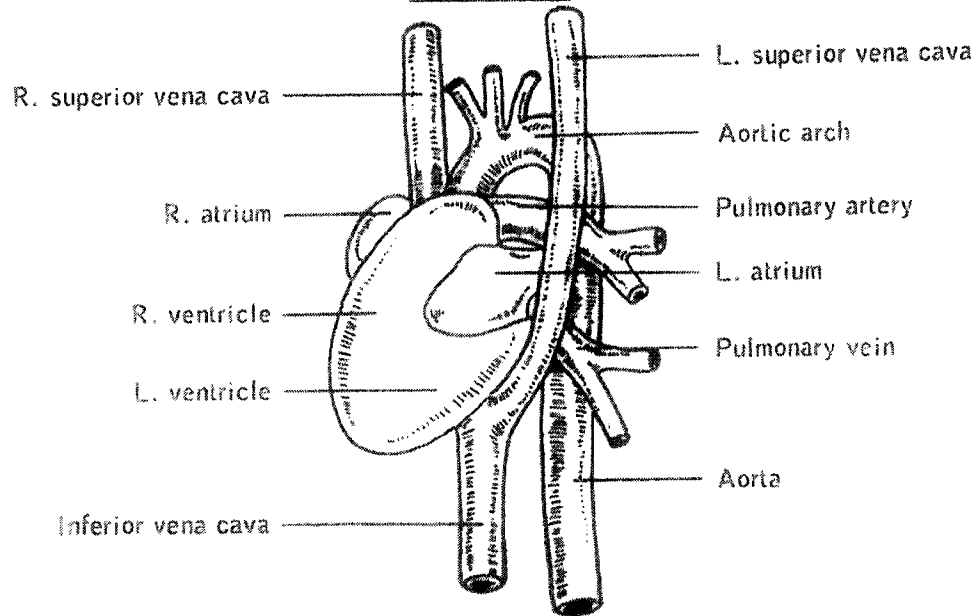


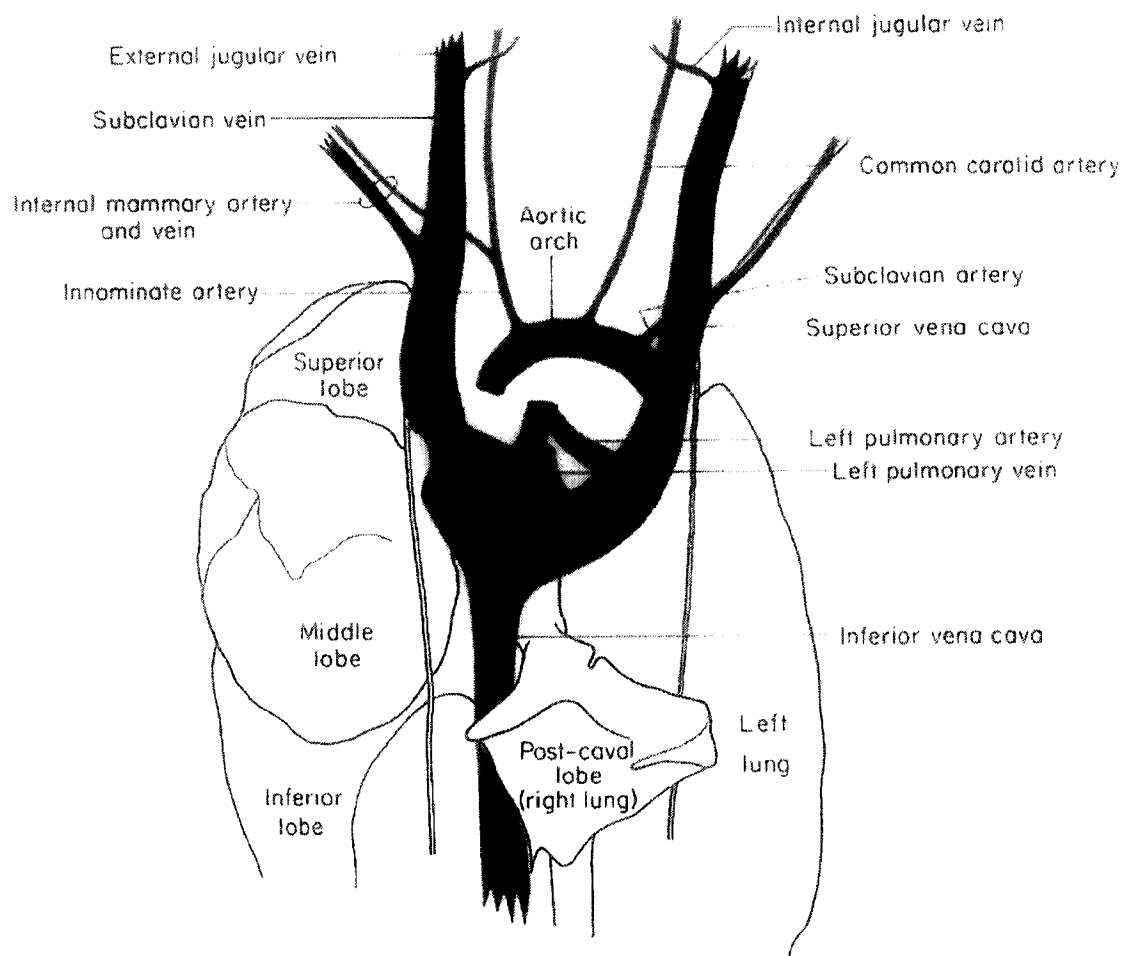


Thoracic viscera *in situ*.

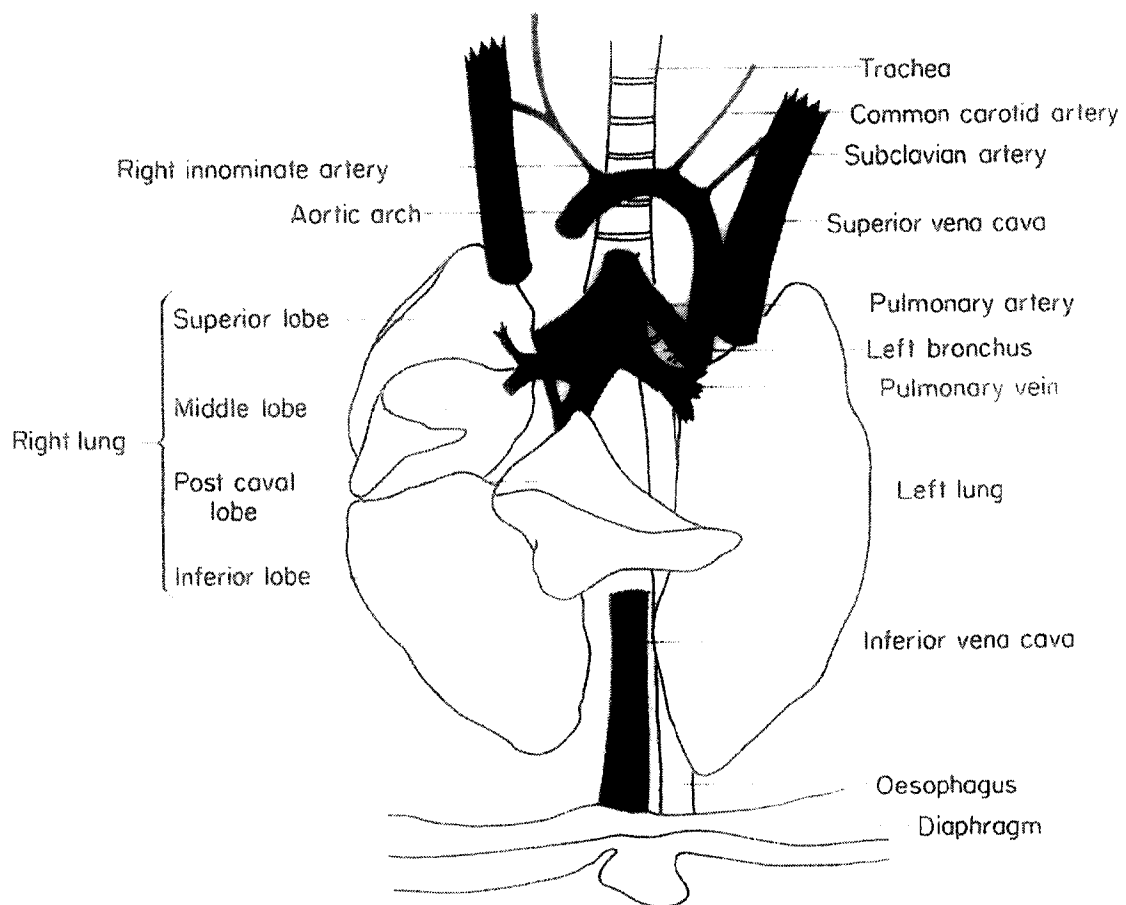


Heart in situ.

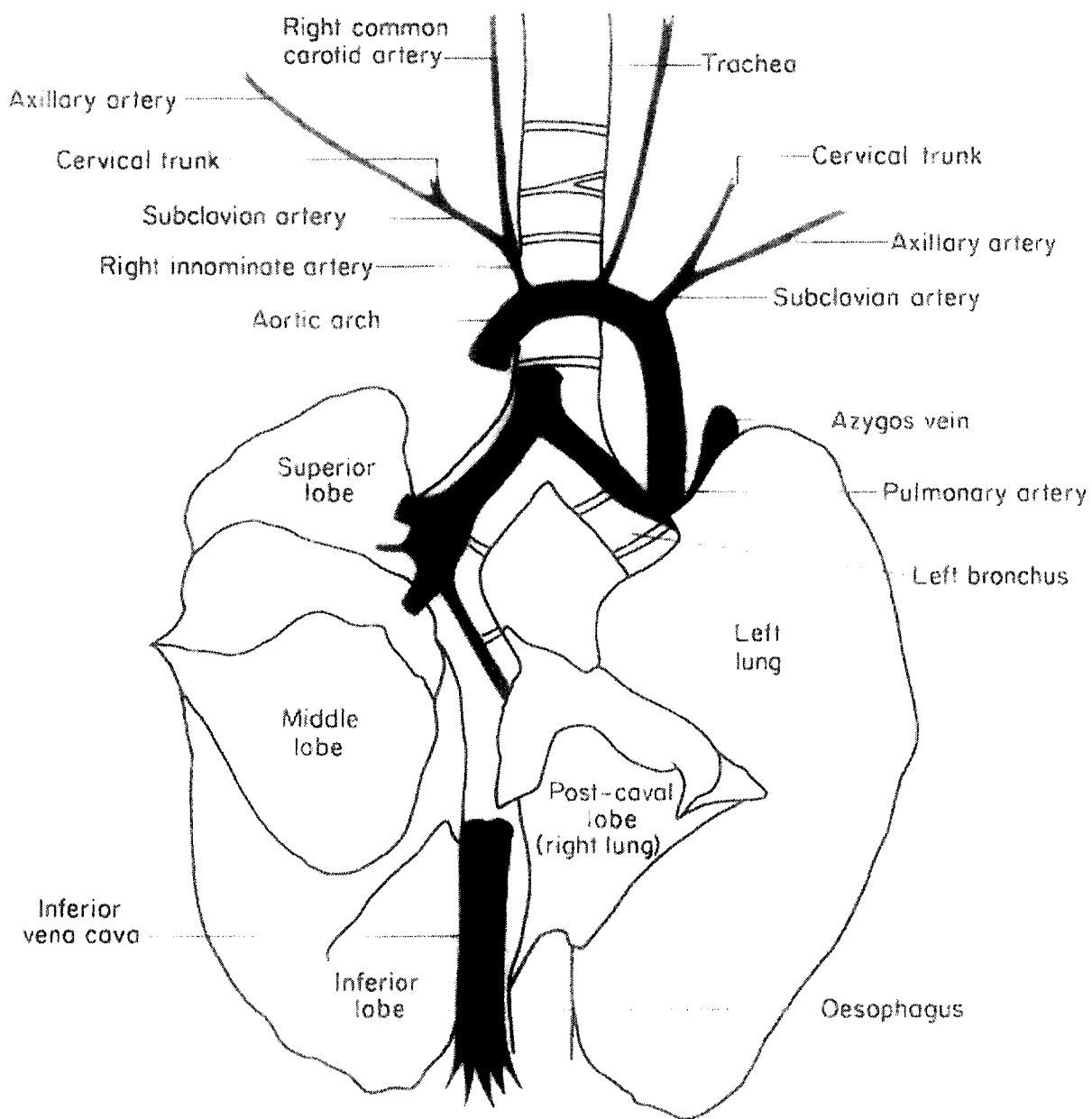




Thorax. Heart has been removed.

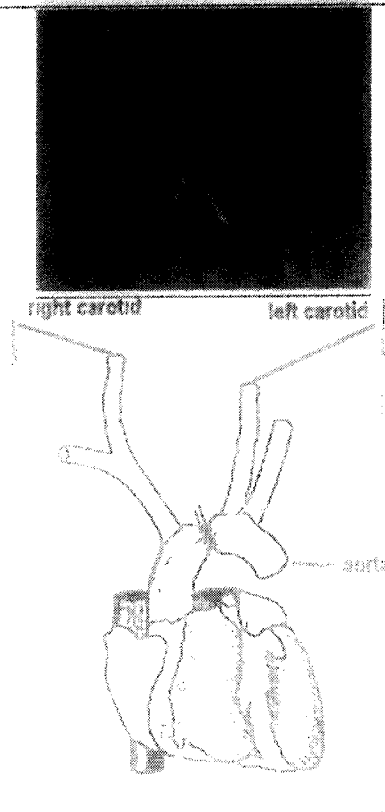
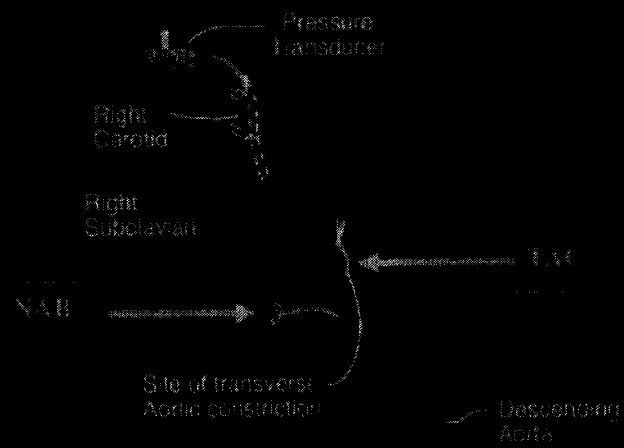


Heart and part of vena cavae removed to show pulmonary vessels.



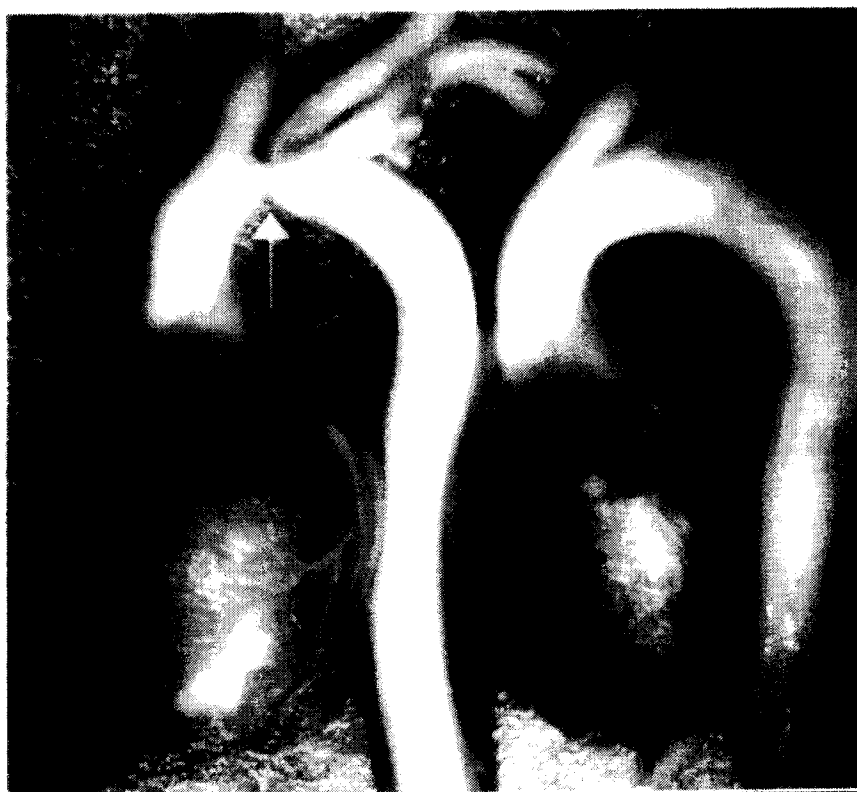
Pulmonary arteries.

Transverse Aortic Constriction (TAC) and Neonatal Aortic Banding (NAB)



MTAB

Sham



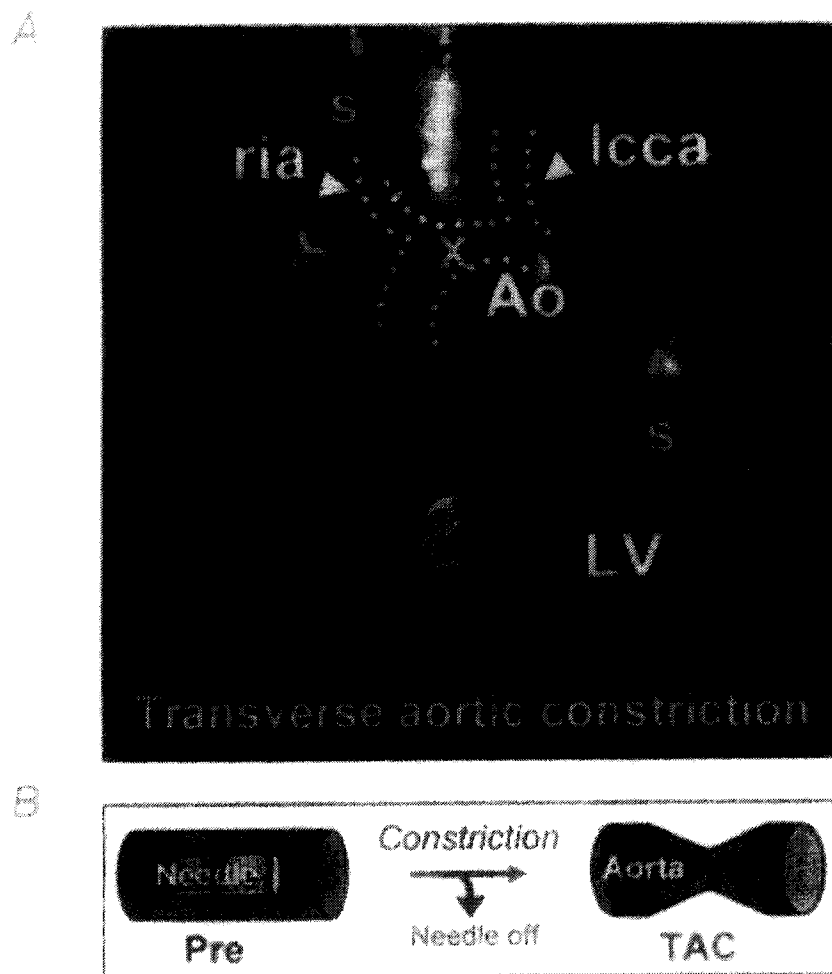
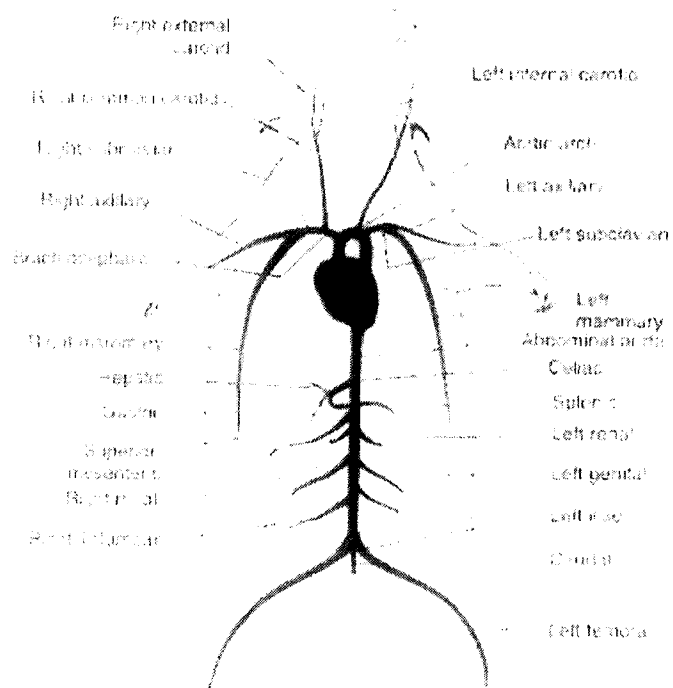
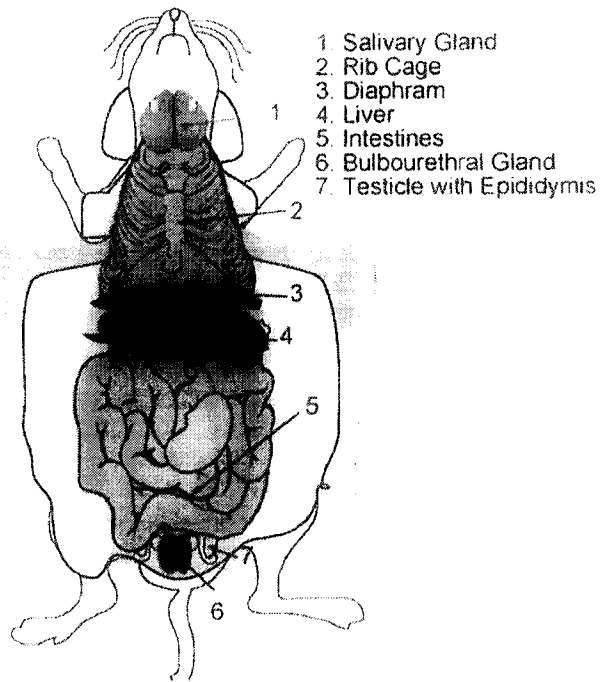


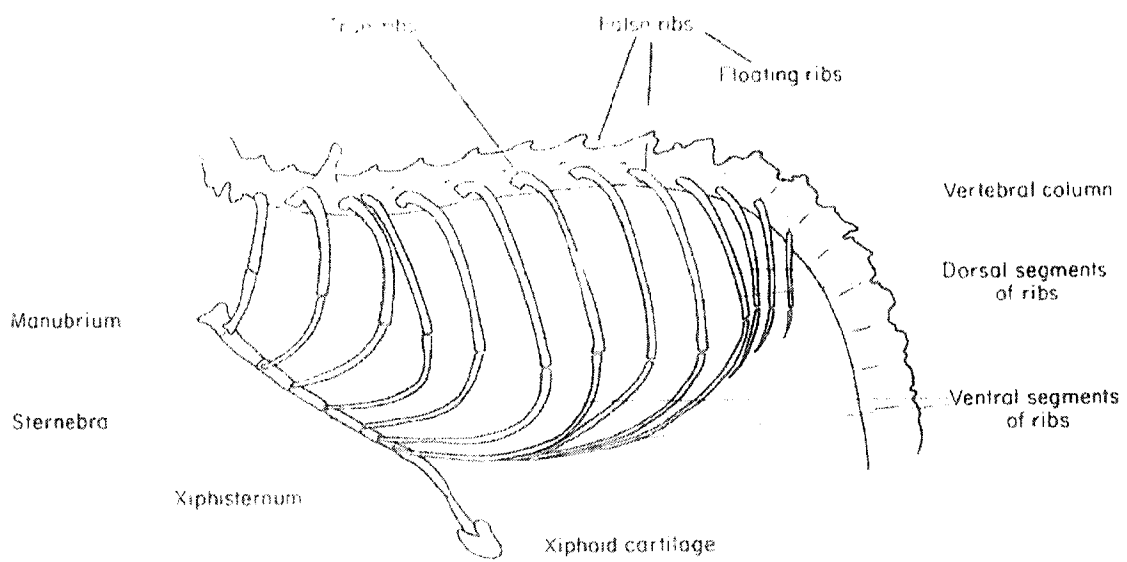
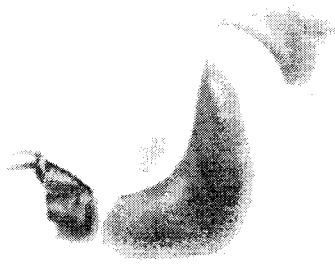
Figure 1. Transverse aortic constriction

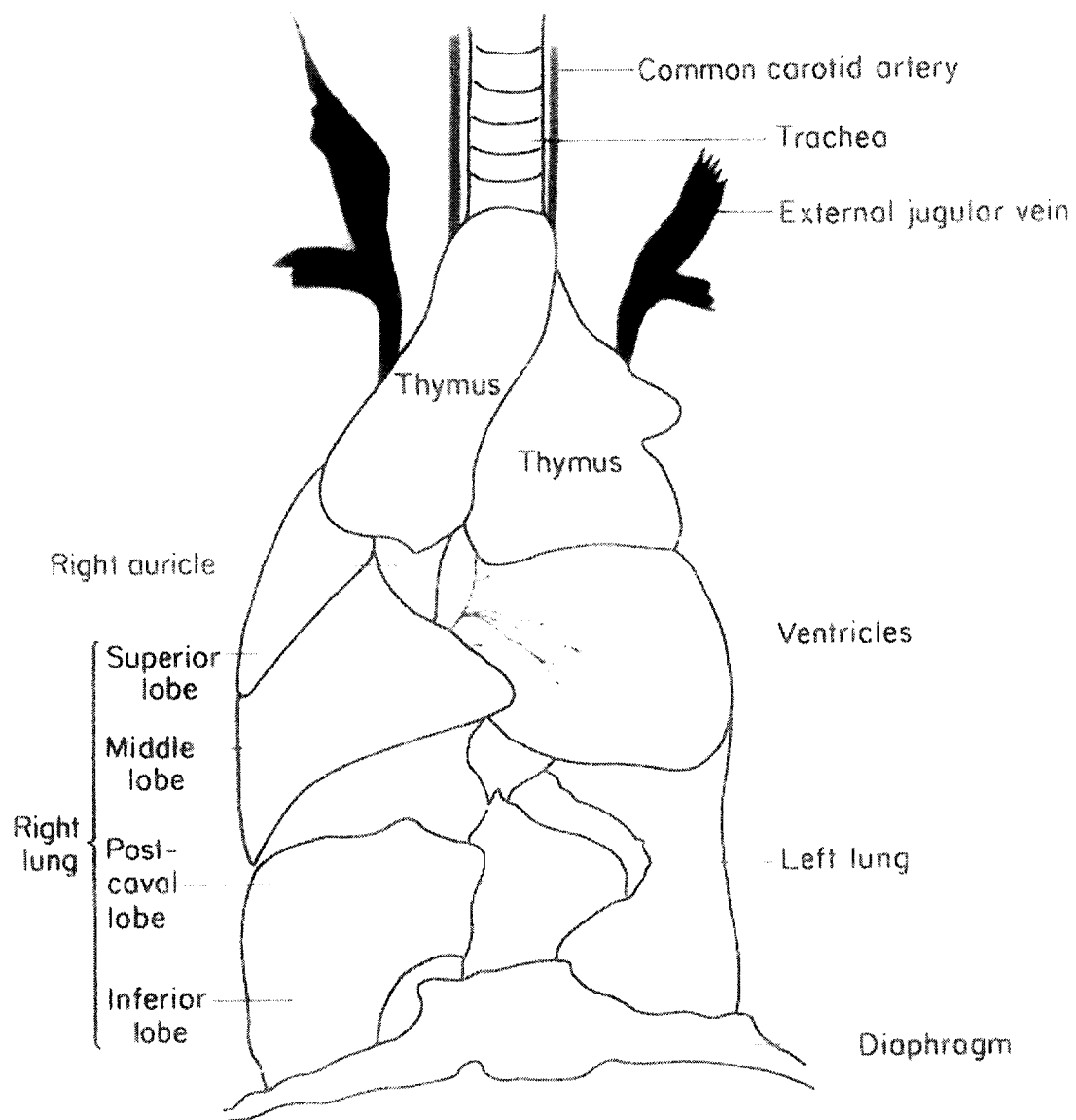
A, aortic constriction (x) was secured by placement of a suture (s) at the level of the thoracic aorta (Ao), between the origin of the right innominate (ria; brachiocephalic) and left common carotid (lcca) arteries. LV, left ventricle. B, transverse aortic constriction (TAC) was imposed using a 27-gauge needle to standardize the extent of aortic stenosis compared to preconstriction (Pre).

SOP Transverse aortic surgery

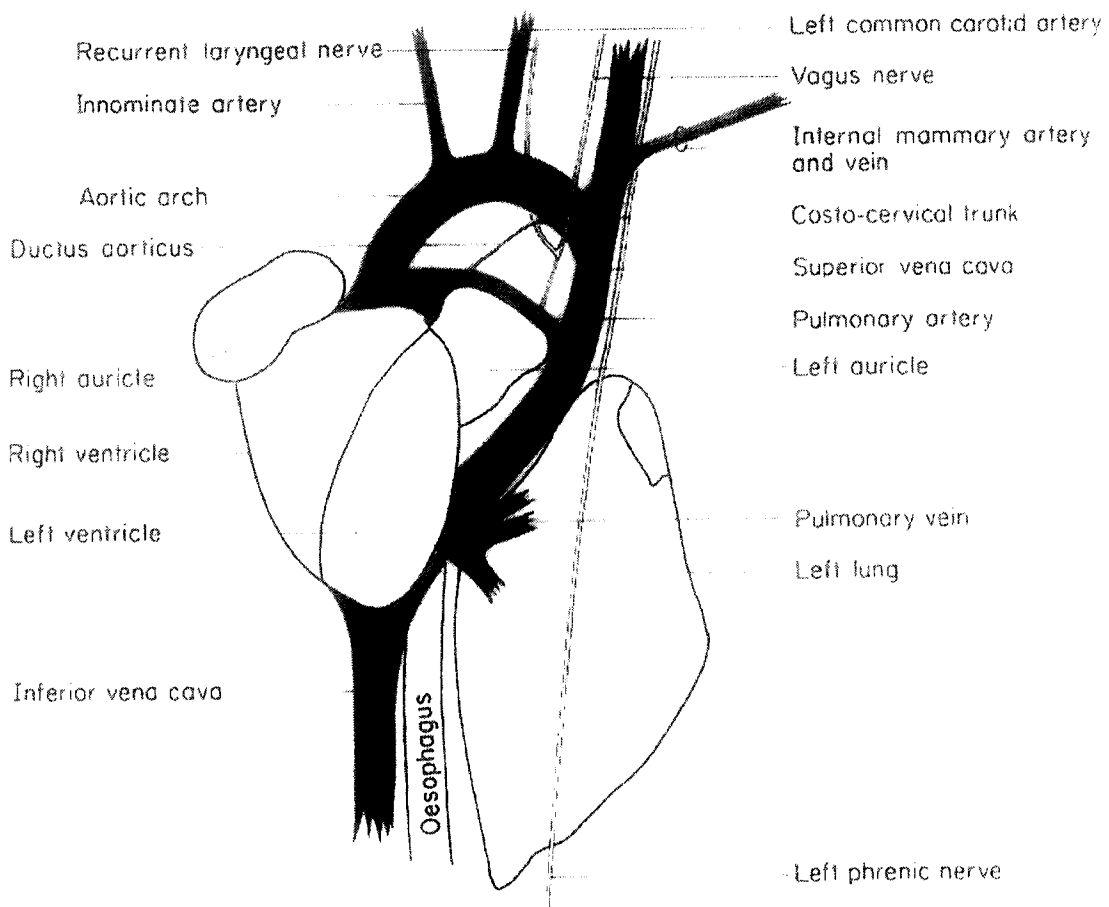
1. Mice (age 9-11 wk, 21-24 g body wt) will be housed in an air-conditioned room with a 12:12-h light-dark cycle and fed standard mouse chow and tap water ad libitum, will undergo transverse aortic constriction (TAC) to produce pressure-load hypertrophy.
2. Anesthesia will be induced with isoflurane 5% (if needed add etomidate 0.8ml, i.p.) and after the intubation (16G plastic tube) maintained by 2% isoflurane gas in room air supplemented with 95% O₂/5% CO₂. Premedication with subcutaneous injection of morphine sulphate 0.2 mg
3. The mice will be placed on a volume ventilator (120 breaths/min, 1.2 ml/g/min).
4. The aortic arch will be isolated by entering the extrapleural space between the second and third rib, and afterwards the transverse aorta will be isolated between the right and left carotid arteries.
5. 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.
6. 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.
7. After removal of the air, the skin will be closed with 5-0 silk, and the animals will be extubated.
8. The mice will be transferred back to their cages and a low dose of oxygen will be given. Postop med: subcutaneous injection of morphine sulphate 0.2 mg, 6x/d, 2d post-op.
9. Animal's respiratory and circulatory status will be checked every 30 minutes during the first 2 hours.
10. After checkup of the wound, animals are brought back to animal holding rooms on the day of following surgery.
11. Sham-operated mice will undergo the same operation except for aortic constriction.



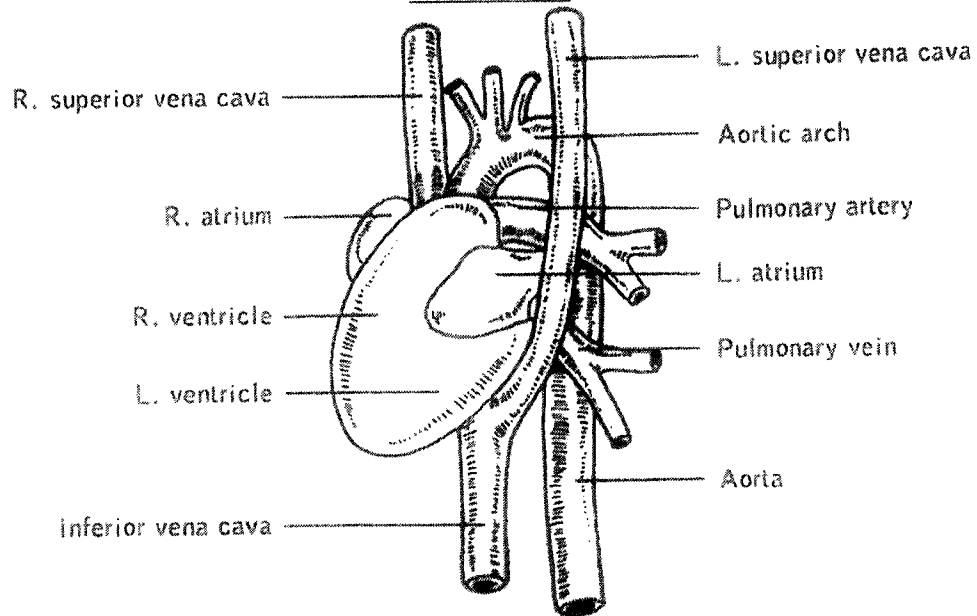


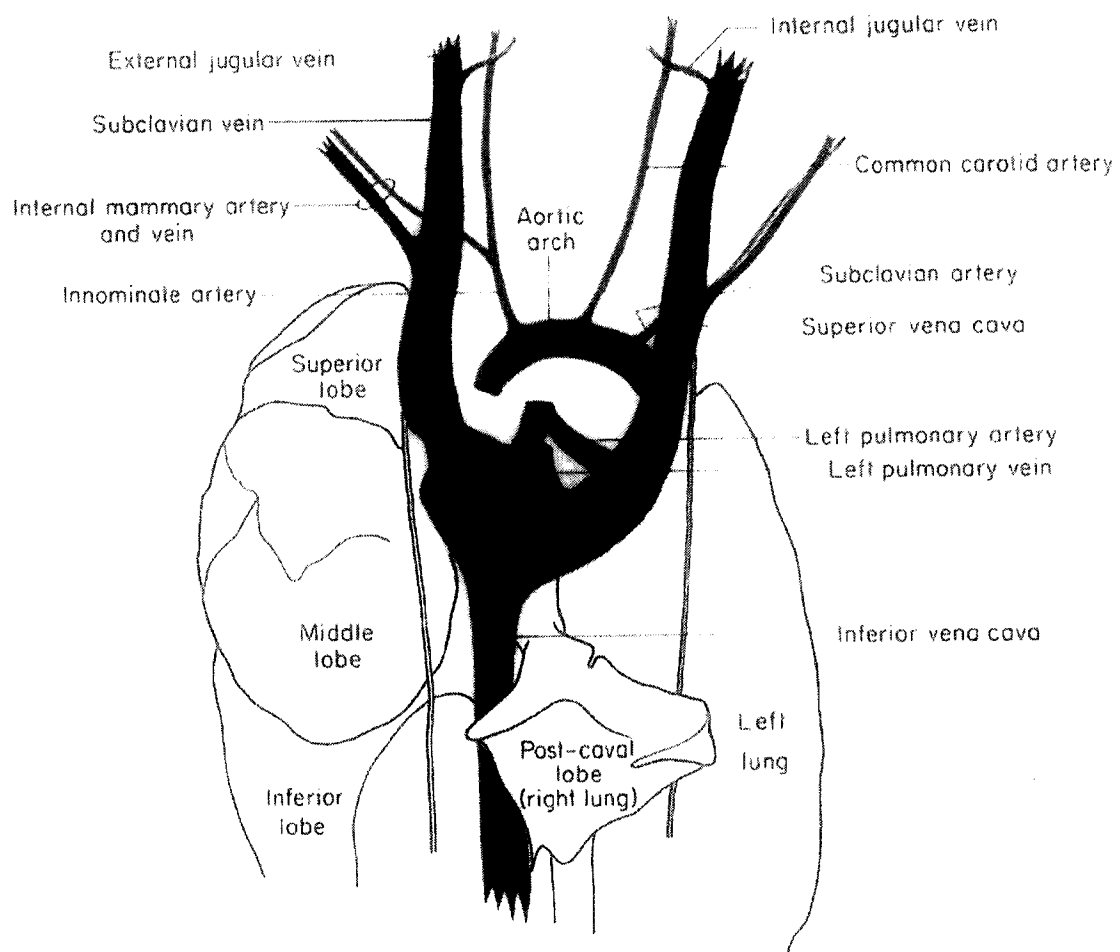


Thoracic viscera *in situ*.

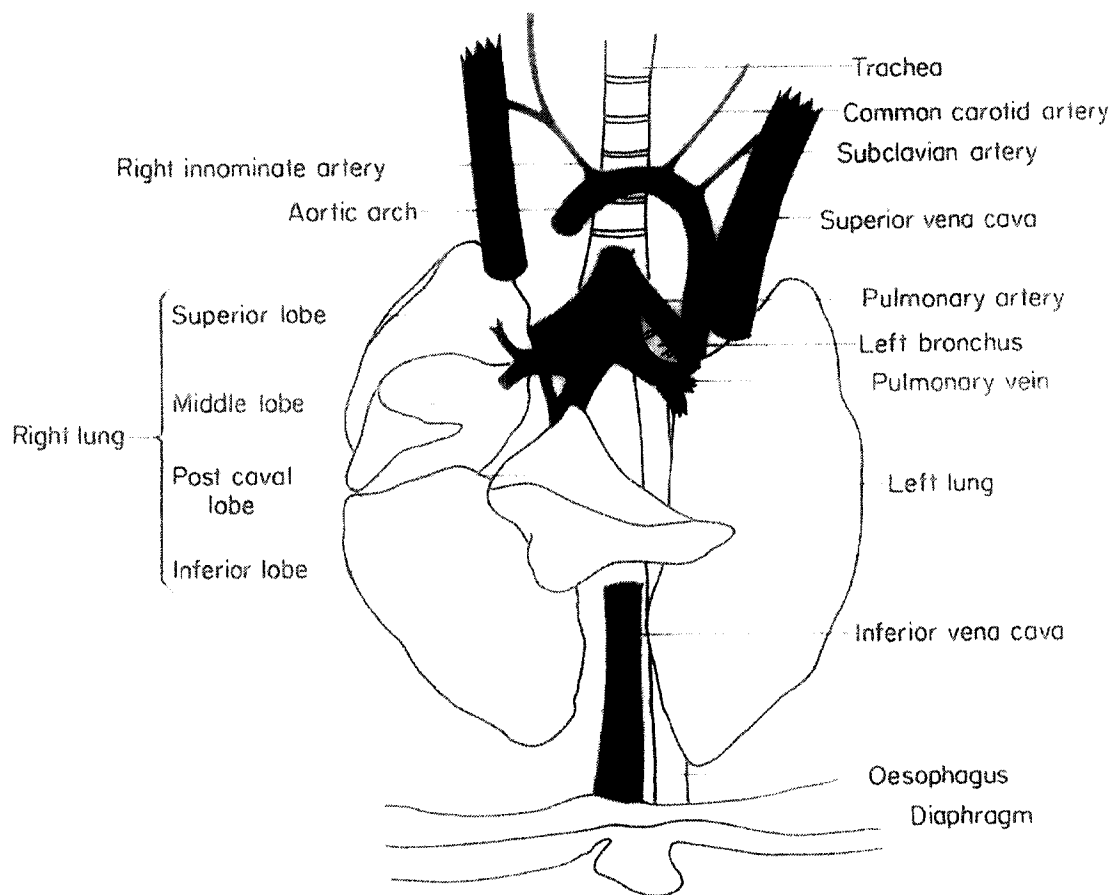


Heart in situ.

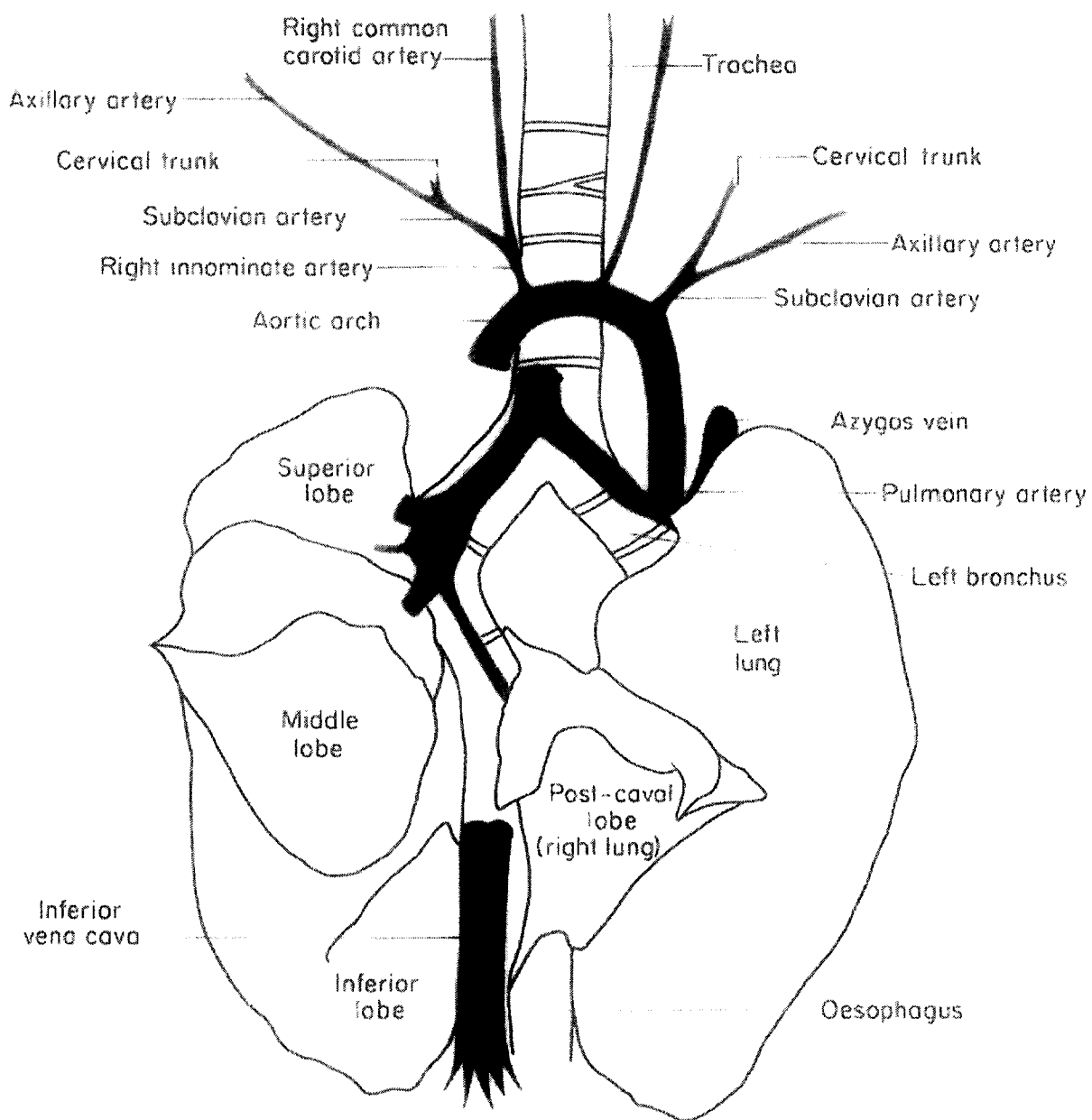




Thorax. Heart has been removed.

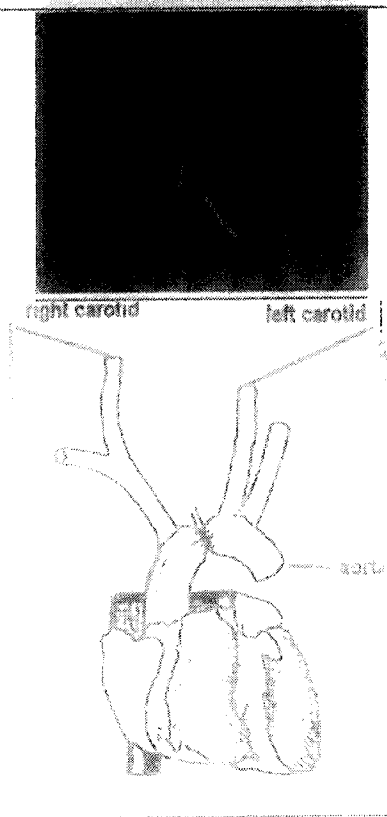
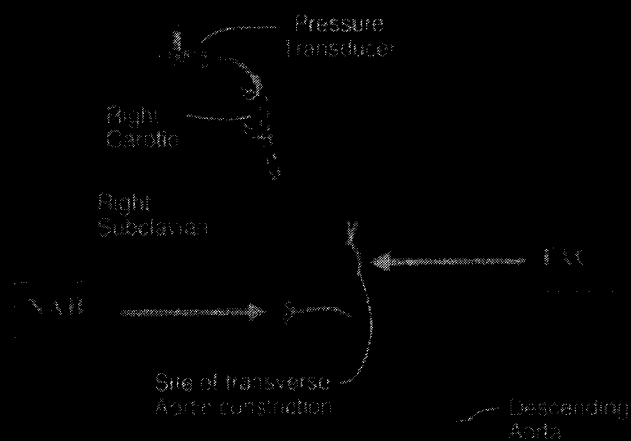


Heart and part of vena cavae removed to show pulmonary vessels.



Pulmonary arteries.

Transverse Aortic Constriction (TAC) and Neonatal Aortic Banding (NAB)



MTAB

Sham



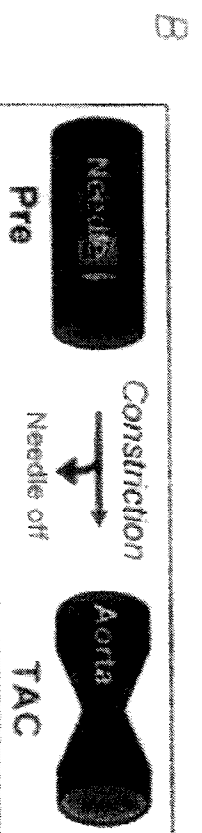
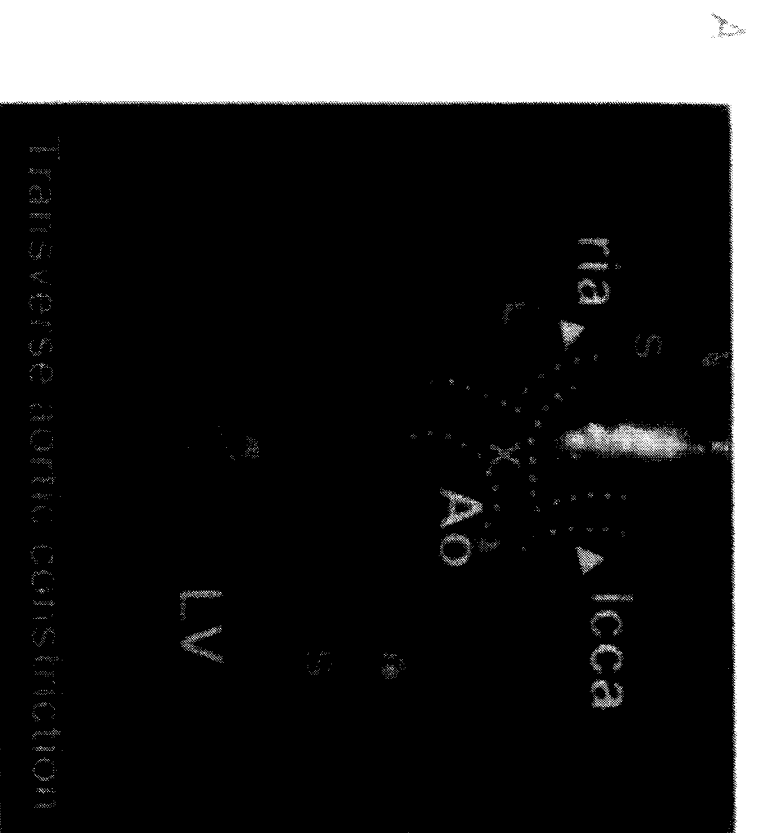
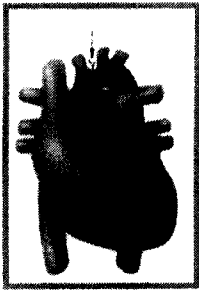


Figure 1. Transverse aortic constriction

A, aortic constriction (X) was secured by placement of a suture (S) at the level of the thoracic aorta (Ao), between the origin of the right innominate (ria; brachiocephalic) and left common carotid (icca) arteries. LV, left ventricle. B, transverse aortic constriction (TAC) was imposed using a 27-gauge needle to standardize the extent of aortic stenosis compared to precontraction (Pre).



SOP CARDIOLOGIE/ 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% O₂/5% CO₂.

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 morfine (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.

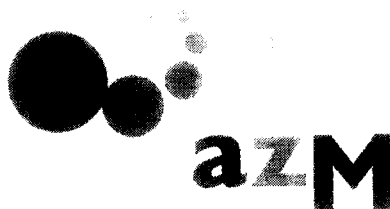
Operatie:

- 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^e en 2^e aftakking) wordt afgebonden.

- Tijdens het afbinden wordt er een afgestompte 27(Gauge) naald tussen de aorta en de hechting gelaten die direct na het afknopen wordt verwijderd (7-0 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, 7 juli 2011

• Betreft: Projectnummer 2011-084

Directeur

Geachte

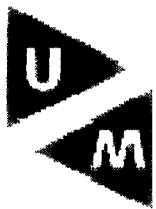
Hierbij bevestig ik, prof. I. J. M. Bax, dat het project met
projectnummer 2011-084

*"Folate as a direct cofactor of eNOS in the different forms of
pressure-overload induced heart failure"*

wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is.

In de hoop u voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 05-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Folate as a direct cofactor of eNOS in the different forms of pressure-overload 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 (2011-084) is reviewed and approved by..". De DEC wenst een gesigneerde brief van .., met vermelding van het DEC protocol nummer (2011-084) 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.

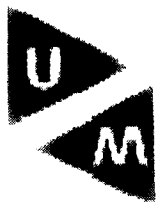
Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-084, 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.

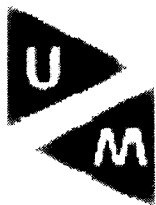
Bijgevoegd vindt u een excelsheet die u kunt gebruiken bij de berekening van de aantallen.

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



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, 28-09-2011

Geachte Onderzoeker,

De herziene versie van uw projectaanvraag: "*Folate as a direct cofactor of eNOS in the different forms of pressure-overload induced heart failure*", is op de DEC vergadering van 23 september 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * De DEC verzoekt de aantallen op het voorblad en 7c in overeenstemming te brengen.
- * De DEC verzoekt de startdatum- en wellicht de einddatum aan te passen.
- * Op het voorblad "overige uitvoerende" aanpassen in PI.
- * Bij punt 1 en punt 5 verzoekt de DEC de zin "In addition, this project, enzovoort" te verwijderen.
- * Punt 3- De DEC vraagt zich af of dit protocol in proefdieren uitgevoerd moet worden en of deze informatie niet gehaald kan worden uit *in vitro* experimenten?
- * Punt 5- De aanleiding van de hier beschreven proeven lijken de positieve effecten van foliumzuur op hartfalen te zijn, zoals eerder door deze onderzoekers gevonden. Het doel van de proeven zoals hier beschreven is te achterhalen of het de links- of rechtsdraaiende isomeer van deze verbinding betreft.

Ten eerste ontbreekt een onderbouwing waarom dit onderscheid van belang is, aangezien foliumzuur, hetgeen goed verdragen wordt in de mens, dit gunstige effect al teweeg brengt. Ten tweede merkt de DEC op dat de onderzoeker zelf aangeeft (onder "5") dat 1 van de 2 isovormen zeer waarschijnlijk geen interactie zal aangaan met eNOS en dus het eindpunt, eNOS(un)coupling wellicht niet zal beïnvloeden. In dit geval is de DEC van mening dat hier aandacht aan gegeven dient te worden in de proefopzet, omdat hiermee een reductie in het aantal dieren kan worden bereikt. Een gefaseerde proefopzet is hier dus van toepassing. Door bijvoorbeeld in een eerste experiment de doses R-THF en L-THF zo te kiezen dat deze overeenkomen met de eerder gebruikte foliumzuurdosis waarvan een gunstig effect is vastgesteld (vermeld onder "2"), en ook de proef vergelijkbaar op te zetten zal uit dat experiment blijken welke van de isomeren de werkzame is. en hoeven er met de niet-werkzame isomeer dan ook verder geen proeven meer op verschillende tijdpunten en doses te worden uitgevoerd, hetgeen een grote reductie in het aantal dieren met een hoog ongerief bewerkstelligt.

- * De DEC verzoekt de typefout op bladzijde 7- bij punt 3c- "TAC 5", aan te passen in "TAC 5 wk".
- * Punt 7b. De zin "These results are not reliable enzovoort" is voor de DEC onduidelijk. De DEC verzoekt dit beter te verwoorden.
- * Punt 7c- De DEC vraagt zich af of ter vergelijking een TAC placebo groep gebruikt wordt van een ander DEC-protocol. Zo ja, gaarne vermelden welk.
- * De groepen dienen gerandomiseerd te worden.
- * Bij punt 9a verzoekt de DEC te onderbouwen waarom de echo niet onder anesthesie gebeurt.

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 2011-084, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoorden op vragen DEC 2011-084

Vraag 1: De DEC verzoekt de aantallen op het voorblad en 7c in overeenstemming te brengen.

Antwoord 1: Dit is aangepast (groep 5,6,7, 8 en 9). Excuses hiervoor.

Vraag 2: De DEC verzoekt de startdatum- en wellicht de einddatum aan te passen.

Antwoord 2: Dit werd aangepast.

Vraag 3: Op het voorblad "overige uitvoerende" aanpassen in Pl.

Antwoord 3: Dit werd aangepast (WB/punt 6)

Vraag 4: Bij punt 1 en punt 5 verzoekt de DEC de zin "In addition, this project, enzovoort" te verwijderen.

Antwoord 4: Dit werd verwijderd bij punt 1 en 5.

Vraag 5: Punt 3- De DEC vraagt zich af of dit protocol in proefdieren uitgevoerd moet worden en of deze informatie niet gehaald kan worden uit *in vitro* experimenten?

Antwoord 5: Dit is niet mogelijk gezien 1) men er niet in slaagt om op een consecutieve manier eNOS te onkoppelen in een proefbuis en 2) de exacte bron van superoxide die in vivo de ontkoppeling veroorzaakt niet gekend is en dus ook niet kan nageboost worden in een testbuis. Dit werd (in het Engels) toegevoegd bij punt 3.

Vraag 6: Punt 5- De aanleiding van de hier beschreven proeven lijken de positieve effecten van foliumzuur op hartfalen te zijn, zoals eerder door deze onderzoekers gevonden. Het doel van de proeven zoals hier beschreven is te achterhalen of het de links- of rechtsdraaiende isomeer van deze verbinding betreft.

Ten eerste ontbreekt een onderbouwing waarom dit onderscheid van belang is, aangezien foliumzuur, hetgeen goed verdragen wordt in de mens, dit gunstige effect al teweeg brengt. Ten tweede merkt de DEC op dat de onderzoeker zelf aangeeft (onder "5") dat 1 van de 2 isovormen zeer waarschijnlijk geen interactie zal aangaan met eNOS en dus het eindpunt, eNOS(un)coupling wellicht niet zal beïnvloeden. In dit geval is de DEC van mening dat hier aandacht aan gegeven dient te worden in de proefopzet, omdat hiermee een reductie in het aantal dieren kan worden bereikt. Een gefaseerde proefopzet is hier dus van toepassing. Door bijvoorbeeld in een eerste experiment de doses R-THF en L-THF zo te kiezen dat deze overeenkomen met de eerder gebruikte foliumzuurdosis waarvan een gunstig effect is vastgesteld (vermeld onder "2"), en ook de proef vergelijkbaar op te zetten zal uit dat experiment blijken welke van de isomeren de werkzame is, en hoeven er met de niet-werkzame isomeer dan ook verder geen proeven meer op verschillende tijdpunten en doses te worden uitgevoerd, hetgeen een grote reductie in het aantal dieren met een hoog ongerief bewerkstelligt.

Antwoord 6: Ik dank de DEC voor de zeer uitgebreide verwoording. Echter, volgende argumenten zijn van belang:

- Het is inderdaad zo dat een lage dosis (0.5-20 mg) foliumzuur goed verdragen wordt, echter wanneer we de vermelde dosissen gaan extrapoleren naar de mens, komen we op dagelijkse innames van 800-1200 mg.
- Wij hebben inderdaad al gevonden dat foliumzuur een gunstig effect heeft, doch tot op heden hebben we het exacte werking mechanisme nog niet kunnen

achterhalen: Is dit door een puur antioxidant effect of door een directe eNOS modulatie. Deze experimenten zullen het aantonen. Wij zijn akkoord dat wanneer we een duidelijk verschil zien, we **geen bijkomende experimenten met de niet-actieve vorm zullen uitvoeren. Het onderzoek zal in stappen worden uitgevoerd, waarbij we de 1 (en evt. de 5 wk) wk-exp als laatste zullen uitvoeren.**

- Bijkomend, het is van het grootste belang om te weten welke vorm exact nodig is om evt. eNOS modulatie te bekomen. De andere vorm zal inderdaad- zoals reeds aangegeven – niet met eNOS interageren, maar zou wel ongewenste andere interacties kunnen hebben. Dit is ook de reden waarom als rescue therapie bij chemo er alleen de L-vorm wordt gegeven (dit zijn slechts 1x-of alvast korte periodes van toediening). De gegevens van het nut van foliumzuur bij chemotherapie kunnen niet geëxtrapoleerd worden naar de eNOS/cardiologie, omdat dit een totaal ander mechanisme is.
- De dosis is van belang, aangezien de bimodale respons curve van andere eNOS modulatoren (JMCC, Moens, 2011).
Dit werd beknopt (in het Engels) toegevoegd aan punt 5.

Vraag 7: De DEC verzoekt de typefout op bladzijde 7- bij punt 3c- “TAC 5”, aan te passen in “TAC 5 wk”.

Antwoord 7: Dit werd aangepast.

Vraag 8: Punt 7b. De zin “These results are not reliable enzovoort” is voor de DEC onduidelijk. De DEC verzoekt dit beter te verwoorden.

Antwoord 8: Wij hebben dit aangevuld met: Estrogens does have a cardioprotective effect in heart remodeling-studies. It is known (e.g. Koricanac et al. Eur. J Pharmacol 2011) that the estrogen signalling pathway interferes with cardiac eNOS. Therefore, we can not mix female and male results. We do realise that also investigation of the female heart is important but this will be performed in a 2nd study by our collaborators at Charite university in Berlin.

Vraag 9: Punt 7c- De DEC vraagt zich af of ter vergelijking een TAC placebo groep gebruikt wordt van een ander DEC-protocol. Zo ja, gaarne vermelden welk.

Antwoord 9: Wij dachten initieel de controle data te gebruiken van `dec 2010-008. Echter, gezien het tijdsverloop (bijna 2j verschil) zijn wij toch genoodzaakt 8 dieren toe te voegen (berekening is toegevoegd bij aanvraag, voorpagina is aangepast, alsook totale n).

Vraag 10: De groepen dienen gerandomiseerd te worden.

Antwoord 10: Dit werd toegevoegd aan punt 8: “Group 1 and 2 will be randomized and also group 3 and 4.”

Vraag 11: Bij punt 9a verzoekt de DEC te onderbouwen waarom de echo niet onder anesthesie gebeurt.

Vraag 11: Wij hebben dit als volgt onderbouwd ~ For analysis of the heart function, we will use a short-axis evaluation. This is a very limited echocardiographic exam of 1 min max. 1 picture (of the short axis) is taken and is analysed afterwards. Because of the short duration (1 min max in experienced hands,) no anaesthesia is necessary. The mice is taken in one hands of an investigator (similar when you would place an i.p. injection) and one single image is taken.”

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
25-10-2011

Project: *Folate as a direct cofactor of eNOS in the different forms of pressure-overload induced heart failure.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM
Dr. R. Hoenderken
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM
T (043)

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 de opmerking, dat de DEC een terugkoppeling wenst van de gefaseerde proefopzet met betrekking tot de niet actieve vorm, alvorens de genoemde experimenten in week 1 en 5 uit te voeren.**

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-084
Diersoort: muis
Aantal dieren: 120
Einddatum: 21-10-2015

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

