

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC-UM

Nieuw

Versie 2006

DECNR: 2011-109
Ontvangen: 12-08-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
	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:

Quantification of beneficial effects of folic acid on decreased physical activity and increased anxiety in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity

startdatum 01/11/2011

einddatum 30/09/2012

Duur van de proef¹⁰: 17d

Naam

Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)

E-mailadres

Bevoegdheid⁹ Cap. groep /afdeling

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

	Art.9	
	Art.9	
	Art. 9	
	Art 12	
	Art 12	
	Vakgroep voorzitter en wetenschappelijk beoordeelbaar.	

Diergroep	1	2	3	4
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Ctrl/exp/sham	Sham with placebo	Sham with FA 0.4mg/g/day	24h experiment Dox Tx with placebo	24 h experiment Dox Tx with FA 0.4mg/g/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	10	10	10	10
Geslacht	M	M	M	M
Dieren immuuncompetent ?	Yes	Yes	Yes	Yes
Leeftijd/gewicht	age 8 wk, 21-24 g body wt	age 8 wk, 21-24 g body wt	age 8 wk, 21-24 g body wt	age 8 wk, 21-24 g body wt
Doel van de proef *	31	31	31	31
Belang van de proef *	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01
Anesthesie *	01	01	01	01
Pijnbestrijding *	02	02	02	02
Mate ongerief *	03	03	05	05
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01
Diergroep	5	6		
	Group 5	Group 6		
Ctrl/exp/sham	10 day experiment Dox Tx with placebo	10 day experiment Dox Tx with FA 0.4mg/g/day		
Diersoort	Mice	Mice		
Stam	C57Bl/6	C57Bl/6		
Construct / mutatie ?	No (WT)	No (WT)		
Herkomst (leverancier) *	(			
Aantal	26	17		
Geslacht	M	M		
Dieren immuuncompetent ?	Yes	Yes		
Leeftijd/gewicht	age 8 wk, 21-24 g body wt	age 8 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 *	02	02		
Mate ongerief *	05	05		
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: Quantification of beneficial effects of folic acid on decreased physical activity and increased anxiety in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity

1. Doel van de proef

Background: Doxorubicin-induced cardiotoxicity is a horrible side-effect of the use of the chemotherapeutic agent doxorubicin. Patients survive their cancer but can develop terminal heart failure. **Decreased activity and increased anxiety have been associated with both chemotherapy and heart failure**

This study is following on DEC-2010-007. In DEC – 2010-007 we have demonstrated that modulating endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by adding folic acid 0.4mg/g/day significantly delays and reduces acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. During that study we had the impression that animals with doxo-induced cardiotoxicity receiving folic acid had a higher degree of physical activity. **We need to quantify this impression.**

Hypothesis : Folic acid improves physical activity and decrease anxiety in a model of acute doxorubicin-induced cardiotoxicity

Objectives: This study is aimed to evaluate physical and behavioural activity following folic acid therapy in doxorubicin (DOX)- acute cardiotoxicity, in c57BL/6J mice.

To continue the same terminology as in the ACUTE-protocol refers to acute cardiac toxicity in a 10d protocol

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



- The use of doxorubicin as a highly efficacious anti-neoplastic agent in both adults and children has been hampered by acute cardiotoxicity and chronic ventricular dysfunction. I have preliminary evidence that NOS-dependent reactive oxygen species (ROS) has a pathogenetic role in doxorubicin-induced cardiotoxicity and that administration of the eNOS modulator folic acid can prevent doxorubicin-induced apoptosis and superoxide generation without affecting the anti-tumor effects of doxorubicin.
- DOX administration can induce a wide variety of acute cardiotoxic effects, including transient cardiac arrhythmia, nonspecific electrocardiographic abnormalities, pericarditis and heart failure (HF).
- This research is translational i.e. basic science with a direct and strong extrapolation towards the clinic. **This research is extremely important to further improve the therapy for doxorubicin-induced cardiotoxicity in e.g. patients with breast cancer or lymphoma or in children with pediatric tumors.** These patients – when they survive their cancer – are at risk to develop a life-threatening form of heart failure, due to the cardiotoxic effects of doxorubicin.
- **DOX and HF are associated with decreased physical activity and increased anxiety.** This study will quantify the beneficial effects of folic acid on these parameters

3. Alternatieven

We are well-aware of the discomfort (anorexia → death) that is caused by administration of doxorubicin to the mouse. Doxorubicin-induced heart failure cannot be investigated in vitro. There is no human material available to explore, neither for the experimental neither for the control group.

4. Ethische afweging

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

- We are aware of the severe doxo-induced symptoms including doxorubicin-induced death that can happen in this model.
- However, we do need to quantify the possible beneficial effects of folic acid on doxorubicin-induced decreased physical activity and increased anxiety

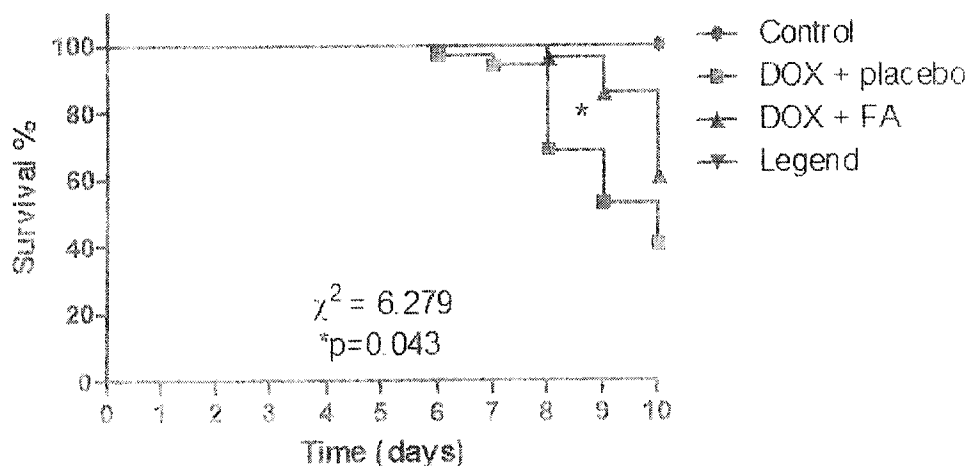
5. Wetenschappelijke onderbouwing

Background: Doxorubicin belongs to the group of the anthracyclines, which are antineoplastic drugs that are widely applied to treat a variety of solid tumors, breast carcinoma and hematological malignancies. Unfortunately, its use has been hampered by conventional toxicities and cardiotoxicity. Cardiotoxicity manifests in several forms, from supraventricular arrhythmia, nonspecific ST- changes and pericarditis to the more late-onset decompensated ventricular failure and sudden death. Beta-adrenergic blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors, which form the arsenal of heart failure treatment, have been useful in managing cardiac dysfunction resulting from anthracycline use. Of note, these agents have provided no success in the prevention or limiting of cardiac injury, but have only been beneficial for palliation.

Although numerous mechanisms have been proposed, most studies support the view that an increase in oxidative stress, evidenced increases in the levels of ROS, and lipid peroxidation, along with reductions in the levels of antioxidants and sulfhydryl groups, play a key role in the pathogenesis of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Recently, we and others have evidence of a pathogenetic role of NOS-dependent ROS-generation in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Furthermore, we have preliminary data suggesting that modulating eNOS by administration of folic acid significantly reduces superoxide-generation and apoptosis in an acute model of cardiotoxicity. Therefore, reducing superoxide generation, and more in detail, reducing eNOS-dependent superoxide generation by eNOS modulators can be considered to be effective in preventing, or even reversing, doxorubicin-induced ventricular dysfunction in oncology-patients.

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

Survival curves DOX +/- FA



In this study, we will investigate the anxiolytic potential of folic acid therapy and also its effect on physical activity in a mouse model of doxo-induced HF. We aim to study the effect of FA therapy on the quality of life and a sense of well-being.

6. Wetenschappelijke beoordeling

- This project was scientifically reviewed and approved by : (see attachment)
- This protocol was never reviewed or rejected before by a DEC of another institution. The whole study is based on previously published methodology.

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species: mice.

Stam: c57BL/6J

Herkomst

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

7b. Sexe

Male:

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

7c. Aantallen

For behavioural testing we need 10 animals per group to detect a relevant mean difference in locomotor activity of 0.25 (δ) with a variance (σ) of 0.2 (based on earlier studies by the) when using a power of 0.80 and alpha of 0.05.

That is: $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (0.2/0.25)^2 = 10.05$.

However, based on previous studies we also know that 60% animals do not survive the doxorubicin treatment within 10 days. This means we have to add 16 animal to the doxorubicin group, which will result in $(10.05/(1-0.6)=25.125)$ 26 animals. In addition, folic acid treatment is expected to reduce doxorubicin-induced mortality by 20 % (they have mortality 40%). This means we have to add 7 animals to the doxorubicin/folic acid group.

The final numbers are summarized in the table.

Group	Treatment doxorubicin	Treatment folic acid	<i>n</i>
1	Vehicle (normal saline)	Vehicle (placebo)	10
2	Vehicle(normal saline)	Folic acid	10
3	Doxorubicin 24h	Vehicle (placebo)	10
4	Doxorubicin 24h	Folic acid	10
5	Doxorubicin 10d	Vehicle (placebo)	26
6	Doxorubicin 10d	Folic acid	17

Total n= 83

Note

FA 0.4mg/g/day

normal saline i/p 0.01 ml/g body weight (calculated by using the similar volume of DOX i/p)

DOX i/p injection 20mg/kg (i.e 0.01 ml/g BW)

Reading parameter ('Uiteesparameter'): locomotoric activity, *based on earlier behavioural studies by the*

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

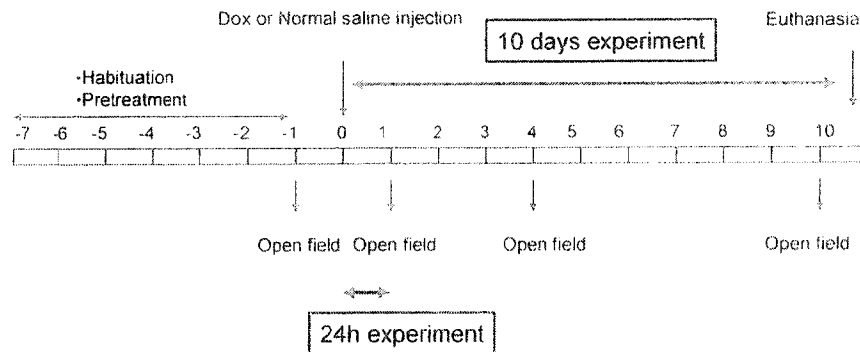
We found a lower drop -out% with the high dose of folic acid (DEC 2010-007) i.e. 40%, and used this lower % in this new DEC. There is no realistic possibility to reduce toxicity-induced mortality. The only theoretical possibility is to reduce the dosis of dox, however then this drug will have less or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

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

Calculation of drop-out: see above mentioned at point 7c

8. Experiment

Experimental setup



Doxorubicin administration (24h experiment) and Behavioral testing time line

Week	Day	Experimental date	Interventional/Test
1	1	-1	Open field (20 min)
	2	0	Doxorubicin treatment
	3	1	Open field (20 min) / perfusion

Doxorubicin administration (10 days experiment) and Behavioral testing time line

Week	Day	Experimental date	Interventional/Test
1	1	-1	Open field (20 min)
	2	0	Doxorubicin treatment
	3	1	Open field (20 min)
	4	2	
	5	3	
	6	4	Open field (20 min)
	7	5	
2	8	6	
	9	7	
	10	8	
	11	9	
	12	10	Open field (20 min)
	13	11	Perfusion

One day before treatment, physical activity testing will be performed to have a behavioural baseline which will also be used to assign animals to balanced experimental groups. After treatment, open field testing will be done at day 1, 4 and 10. The day after the last open field test, mice will be euthanized with overdosis isoflurane (chamber). Subsequently, the hearts will be analysed.

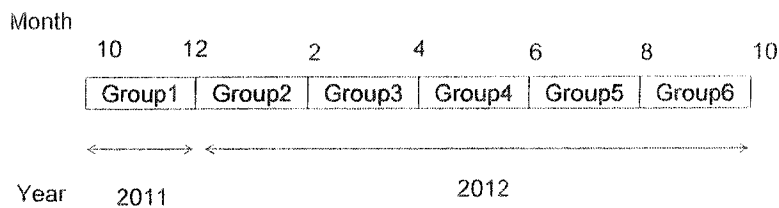
Behavioral test protocol

- * *Open field:* An open field is used to assess anxiety/locomotor activity changes (Prickaerts et al., 1996). The test is conducted in a square Plexiglas base (50x50cm) with a gray floor and 25 cm high black Plexiglas walls and it is divided into 4 equal arenas (25x25cm each) separated by 25 cm high black Plexiglas walls. Four mice are placed in the center of each open field and able to freely move around for 20 min. The illumination of the room is reduced to 20lx on the floor of the apparatus. The total distance moved is scored automatically via a video camera connected to a video tracking system (The Netherlands).

Planning:

Groep 1-6: year 1 (10/2011-10/2012)

Planning



9 Experimentele condities

9a. Anesthesie

Niet van toepassing/ Not applicable.

9b. Pijnbestrijding

Niet van toepassing/ Not applicable, because practical not possible. Euthanasia will be performed if required (see 9c). We mention pain code 03, because this model (cardiotoxicity-model) is investigating the toxicity caused by doxorubicin. From my own and others (Johns Hopkins University) IV-injections create too much variance in the cardiotoxicity-model, and therefore not useful to reduce the amount of animals needed for the experiment.

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: 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.

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

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

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

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

Zorg

10a. Ongerief



Degree of discomfort due to doxorubicin or normal saline administration

The animals will experience severe discomfort due to the doxorubicin treatment. In addition, animals will experience moderate discomfort during the open field test. The combined discomfort is therefore quantified as severe (score 5).

Sham experiment (no doxo) : normal saline i/p 0.01 ml/g body weight (calculated by using the similar volume of DOX i/p injection 20mg/kg (i.e 0.01 ml/g BW)

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

Consequences of placebo injection	no	1x	max. 10 d
Euthanasia:	Code 2	1x	3 min

In the acute group: doxorubicin will be given 1x (20mg/kg) i.p. (Code 3).
-> total amount of discomfort: Code 5

Acute dox experiments (both 24h and 10 days experiments):

	Discomfort	Freq	Duration
Injection (ip):	Code 3	1x	1-5sec
Consequences of doxo injection:	Code 5	1x	max. 10 d
Euthanasia:	Code 2	1x	3 min

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

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

Degree of discomfort due to behavioral testing

	Nature of discomfort <i>(clinical parameters)</i>	Estimated degree of discomfort	Duration and frequency
Non standard housing	Solitary housing	3	1 day, (4x in 10 days experiment) (2x in 24h experiment)
Anesthesia/Euthanasia	Stress, pain	2	1x
Open field	Open field stress	3	20 min, (4x in 10 days experiment) (2x in 24 h experiment)
Development of cardiotoxicity	Stress, pain, HF, death	5	10 days (1 day in 24h experiment)

10b. Welzijnsevaluatie

The humane endpoints ,welfare evaluation and discomfort scoring sheets have been adjusted according to the meeting between the researchers and the animal welfare officer of CPV.

From the scoring sheet : the moribund score > 25

11. Verzorging en huisvesting

The Animal Facility (CPV) of the University of Maastricht will be responsible for the housing and caring of the animals during the protocol. The mice will be housed in special cages (4-5 per cage) under conditions of controlled humidity, temperature and a 12 h light-dark cycle (lights on 7 AM to 7 PM). Males are housed individually to prevent aggressive behavior due to social housing. Mice will be allowed free access to tap water and chow. The complete experiment will be performed in the basement of the CPV) in the area of

12. Deskundigheid

Doxorubicin and normal saline will be performed by
Behavioral studies will be performed by s (art. 12) from the

13. Standard Operation Procedures (SOP)

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

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

Doxorubicin will be dissolved in NaCl 0.9%.

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

Relevante literatuur

- Neilan *et al.* (2007). Disruption of Nitric Oxide Synthase 3 Protects Against the Cardiac Injury, Dysfunction, and Mortality Induced by Doxorubicin. *Circulation*. 2007;116:506-514.
- Prickaerts J, Raaijmakers W and Blokland A (1996). Effects of myocardial infarction and captopril therapy on anxiety-related behaviors in the rat. *Physiol Behav*. 60, 43-50.

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

Maastricht, 7 juli 2011

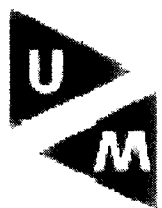
Geachte

Hierbij bevestig ik, dat het project met de titel
*"Effect of acute cardiotoxicity - induced by doxorubicin and folic acid therapy on
physical activity and anxiety- related behaviours in c57BL/6J Mice"*

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: +31 (0) 43 386 2411

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Quantification of beneficial effects of folic acid on decreased physical activity and increased anxiety in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity*", is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * Bij de alternatieven is niet overtuigend aangegeven, dat de doelstelling met behulp van dierexperimenteel onderzoek beantwoord moet worden. Mensgebonden onderzoek is een reëel alternatief dat eerst moet worden onderzocht. Dit weegt extra zwaar aangezien de dieren in het voorgestelde onderzoek ernstig ongerief wordt aangedaan. Bovendien is de mechanistische, reductionistische aanpak, gezien de doelstelling 'menselijke gezondheid' en de te onderzoeken verschijnselen 'verminderde beweging en toegenomen angst bij kankerpatiënten', niet voor de hand liggend. Het gaat om complexe fenomenen die op uiteenlopende wijzen kunnen worden beïnvloed. Dan gaat het niet alleen om palliatieve en ondersteunende behandeling, zoals in de ethische afweging wordt gesuggereerd. Psychotherapie en fysiotherapie hebben bij angst en verminderde beweging wel degelijk erkende curatieve effecten. Misschien heeft ook foliumzuur een gunstig effect, maar dat kan via therapeutisch mensgebonden onderzoek worden aangetoond.
- * De DEC is van mening dat het (mogelijk) effect van FA op activiteit niet los gezien kan worden van de verbetering in hartfunctie door FA in de dox-behandelde dieren. De DEC mist ook een wetenschappelijke onderbouwing/ mechanisme: kan op basis van literatuur onderbouwd worden dat FA een onafhankelijk effect heeft op lichamelijke activiteit in het huidige model (wat is het veronderstelde mechanisme?). Met de huidige opzet kan de hypothese slechts eenzijdig getoetst worden, alleen indien de FA behandelde dieren géén verbetering laten zien van locomotor activity, is aangetoond dat FA geen effect heeft. Indien de dieren wel verbetering laten zien, zal aangetoond moeten worden dat dit onafhankelijk is van de verbetering in hartfunctie.

- * De DEC is van mening dat het model verfijnd kan worden. Op tijdstip 8 dagen is het verschil in survival tussen FA- behandelde en onbehandelde groep groter (zie fig). De dieren zijn op dit tijdstip minder ziek en er is minder uitval. Indien in een veranderde opzet het onafhankelijke effect van FA onderzocht kan worden, dan heeft het uitvoeren van de voorgestelde open field test op dag 8 uit oogpunt van verfijning en vermindering de voorkeur.
- * Het 'angst-aspect' wordt niet benaderd met een open-field test (NB geen SOP toegevoegd).
- * **Gezien het voornemen in de conclusie, is de aanvraag verder inhoudelijk niet behandeld.**

Conclusie:

De DEC is voornemens de aanvraag af te wijzen op ethische en wetenschappelijke gronden.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-109, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend

Voorzitter DEC-UM

Cc.

Geachte voorzitter, Geachte

Hierbij de schriftelijke antwoorden op uw vragen betreffende DEC 2011-109
“*Quantification of beneficial effects of folic acid on decreased physical activity and increased anxiety in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity*”, zoals ik dit ook mondeling reeds heb toegelicht.

Vraag 1: Bij de alternatieven is niet overtuigend aangegeven, dat de doelstelling met behulp van dierexperimenteel onderzoek beantwoord moet worden. Mensgebonden onderzoek is een reëel alternatief dat eerst moet worden onderzocht.

Dit weegt extra zwaar aangezien de dieren in het voorgestelde onderzoek ernstig ongerief wordt aangedaan.

Bovendien is de mechanistische, reductionistische aanpak, gezien de doelstelling 'menselijke gezondheid' en de te onderzoeken verschijnselen 'verminderde beweging en toegenomen angst bij kankerpatiënten', niet voor de hand liggend. Het gaat om complexe fenomenen die op uiteenlopende wijzen kunnen worden beïnvloed. Dan gaat het niet alleen om palliatieve en ondersteunende behandeling, zoals in de ethische afweging wordt gesuggereerd. Psychotherapie en fysiotherapie hebben bij angst en verminderde beweging wel degelijk erkende curatieve effecten. Misschien heeft ook foliumzuur een gunstig effect, maar dat kan via therapeutisch mensgebonden onderzoek worden aangetoond.

Antwoord 1: Wij hebben begrip voor deze vraagstelling. Ik vermoed dat de DEC niet op de hoogte is van de extrapolatie van de dosis foliumzuur welke nodig is om dit effect te bekomen. Toediening van 10 mg foliumzuur/d aan een muis komt overeen met een dagelijkse humane dosis rond de 1000 mg (range afhankelijk van extrapolatie 800-1200 mg/d). Dit is significant hoger dan de voedingssupplementen (o.a. ter voorkoming van NTD) van 500-100 microgram en van de 1-x-ige toedieningen als rescue therapie bij methotrexaat behandeling (75-200 mg).

Mechanistisch werken deze behandelingen ook via andere wegen.

Doordat we dit effect op doxo-geïnduceerde complicaties enkel zien bij hoge dosis (en dus niet bij lage dosis) – en deze dosis als een geneesmiddel moet aanzien worden en dus niet als een voedingssupplement – moet volgens de wet op het

geneesmiddelenonderzoek en de ethische toestemming dit eerst preklinisch getest worden.

Ik kan hierbij uit ervaring spreken betreffende een gelijkaardige situatie m.b.t. de klinische infarctstudie. Bijkomend, gezien het unieke karakter van deze bevinding, werd dit door de UM gepatenteerd.

Vraag 2: De DEC is van mening dat het (mogelijk) effect van FA op activiteit niet los gezien kan worden van de verbetering in hartfunctie door FA in de dox-behandelde dieren. De DEC mist ook een wetenschappelijke onderbouwing/ mechanisme: kan op basis van literatuur onderbouwd worden dat FA een onafhankelijk effect heeft op lichamelijke activiteit in het huidige model (wat is het veronderstelde mechanisme?).

Met de huidige opzet kan de hypothese slechts eenzijdig getoetst worden, alleen indien de FA behandelde dieren géén verbetering laten zien van locomotor activity, is aangetoond dat FA geen effect heeft. Indien de dieren wel verbetering laten zien, zal aangetoond moeten worden dat dit onafhankelijk is van de verbetering in hartfunctie.

Antwoord 2: Ik vermoed door deze vraagstelling te lezen dat de DEC onvoldoende

op de hoogte is van de verschillen tussen acute en chronische doxo-geïnduceerde toxiciteit. Hierbij een toelichting: enkel bij chronische toediening van doxo treedt er een vermindering van hartfunctie op. Het zou in dat geval inderdaad moeilijk te onderscheiden of een verbetering van hartfunctie op zichzelf de verbetering in lichamelijke activiteit veroorzaakt. Echter, in DEC 2011-109 wordt enkel het acute model gebruikt, waar er dus geen vermindering is in hartfunctie, enkel een acute toxische reactie/irritatie. Bijgevolg is deze bemerking van de DEC wetenschappelijk incorrect.

Vraag 3: De DEC is van mening dat het model verfijnd kan worden. Op tijdstip 8 dagen is het verschil in survival tussen FA- behandelde en onbehandelde groep groter (zie fig). De dieren zijn op dit tijdstip minder ziek en er is minder uitval. Indien in een veranderde opzet het onafhankelijke effect van FA onderzocht kan worden, dan heeft het uitvoeren van de voorgestelde open field test op dag 8 uit oogpunt van verfijning en vermindering de voorkeur.

Antwoord 3: Wij zijn akkoord om dit model in te korten tot 8d na toediening. Wij hebben dit op vraag van de DEC al voor een andere recente dox-DEC gedaan. Bijkomend kunnen wij de open-field test al proberen uit te voeren op de 4-5d na doxo-toediening. Mocht er dan al een significantie zijn tussen de groepen, dan kan het experiment vroegtijdig gestopt worden.

Vraag 4: Het 'angst-aspect' wordt niet benaderd met een open-field test (NB geen SOP toegevoegd).

Antwoord 4: Ik verwijs hierbij graag naar de schriftelijk reactie van

: In de beschrijving noemen we anxiety/locomotor activity. Het open field kan voor beide gebruikt worden afhankelijk van de opstelling. Zoals wij het in jouw project doen is het primair locomotor activity omdat dat juist de parameter is die je wil meten. Dus een kleine arena (25x25 cm) en eenmalig testen (rond de 20-60 minuten) in relatief donkere omstandigheden. Als je primair angst wil meten dan gebruiken we de grote arena (1x1 m) en testen we 4 dagen achter elkaar (5 min per keer) met iets meer licht erbij. Je kijkt dan naar de tijd in de hoeken. Bange ratten/muizen zitten de meeste tijd in de hoek. Deze maat kunnen we ook in de kleine arena meten en geeft ons dan een aanwijzing of angst mogelijk ook aangedaan is. Om het zeker te weten zou je dan een 'echte' angst test doen, maar dat is niet de insteek van dit project. Dus we nemen angst mee omdat het kan. En het zou zonde zijn om er niet naar te kijken. Laat ik het zo zeggen: we krijgen deze maat er 'gratis' bij.

Aan

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
01-09-2011

Geachte mevrouw

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

In de DEC vergadering van 26 augustus 2011 is uw nieuwe aanvraag 2011-109 aan de orde geweest.

Secretariaat DEC-UM

De DEC is voornemens de aanvraag af te wijzen op ethische en wetenschappelijke gronden.

Bezoekadres

Conform het reglement van de Dierexperimentencommissie van de Universiteit Maastricht (art.7: punt 7.13) handelt de DEC-UM bij het afgeven van een negatief advies betreffende een dierproef als volgt:

- De verantwoordelijke onderzoeker wordt voorafgaande aan het uitbrengen door de DEC-UM van het negatieve advies gehoord. Daartoe wordt hij/zij in kennis gesteld van het voorgenomen advies en de overwegingen die tot dit advies hebben geleid.
- Na de verantwoordelijke onderzoeker gehoord te hebben gaat de DEC-UM over tot het uitbrengen van het definitieve advies, waarbij de overwegingen die tot dit advies hebben geleid, worden vermeld.

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

De DEC-UM nodigt u derhalve uit voor een gesprek op maandag 19 september 2011 om 13.30 uur (locatie wordt later doorgegeven).

Voorzitter DEC-UM

Vicevoorzitter DEC-UM

Verslag van het gesprek met de verantwoordelijke onderzoeker van project 2011-109 dd. 6 oktober 2011.

In verband met het voornemen van de DEC-UM om een negatief advies uit te brengen op project 2011-109, is de DEC-UM verplicht volgens art. 7: punt 7.13 van de Wet op de Dierproeven, de verantwoordelijke onderzoeker voorafgaand aan dit advies te horen.

De Voorzitter deelt de verantwoordelijke onderzoeker de te volgen procedure mede.

Ter info: art. 7: punt 7.13 De DEC-UM handelt bij het afgeven van een negatief advies betreffende een dierproef als volgt:

- De onderzoeker wordt voorafgaande aan het uitbrengen door de DEC-UM van het negatieve advies gehoord. Daartoe wordt hij in kennis gesteld van het voorgenomen advies en overwegingen die tot dit advies hebben geleid, worden vermeld.
- Na horing van de onderzoeker gaat de DEC-UM over tot het uitbrengen van het definitieve advies waarbij de overwegingen die tot dit advies hebben geleid, worden vermeld.
- Wanneer de DEC-UM een negatief advies over een dierproef uitbrengt, mag de dierproef niet worden uitgevoerd. Indien de vergunninghouder, ondanks een negatief advies, de dierproef toch wil uitvoeren is hij verplicht het oordeel te vragen van de Centrale Commissie Dierproeven. Dit oordeel is bindend.

De DEC-UM heeft op 31-08-2011 aan u een brief gestuurd, ref. _____, met de overwegingen.

De overweging zal vermeld worden in het jaarverslag 2011 van de DEC-UM.

De verantwoordelijke begint haar verweer op punt 3 van de brief:

Vraag 3 van de DEC-UM: De DEC is van mening dat het model verfijnd kan worden. Op tijdstip 8 dagen is het verschil in survival tussen FA- behandelde en onbehandelde groep groter (zie fig). De dieren zijn op dit tijdstip minder ziek en er is minder uitval. Indien in een veranderde opzet het onafhankelijke effect van FA onderzocht kan worden, dan heeft het uitvoeren van de voorgestelde open field test op dag 8 uit oogpunt van verfijning en vermindering de voorkeur.

Antwoord verantwoordelijke onderzoeker vraag 3: Wij zijn akkoord om dit model in te korten tot 8d na toediening. Wij hebben dit op vraag van de DEC al voor een andere recente dox-DEC gedaan. Bijkomend kunnen wij de open-field test al proberen uit te voeren op de 4-5d na doxo-toediening. Mocht er dan al een significantie zijn tussen de groepen, dan kan het experiment vroegtijdig gestopt worden.

Vraag 4 van de DEC-UM: Het 'angst-aspect' wordt niet benaderd met een open-field test (NB geen SOP toegevoegd).

Antwoord verantwoordelijke onderzoeker vraag 4: Ik verwijs hierbij graag naar de schriftelijk reactie van _____ In de beschrijving noemen we anxiety/locomotor activity.

Het open field kan voor beide gebruikt worden afhankelijk van de opstelling. Zoals wij het in jouw project doen is het primair locomotor activity omdat dat juist de parameter is die je wil meten.

Dus een kleine arena (25x25 cm) en eenmalig testen (rond de 20-60 minuten) in relatief donkere omstandigheden. Als je primair angst wil meten dan gebruiken we de grote arena (1x1 m) en testen we 4 dagen achter elkaar (5 min per keer) met iets meer licht erbij. Je kijkt dan naar de tijd in de hoeken. Bange ratten/muizen zitten de meeste tijd in de hoek. Deze maat kunnen we ook in de kleine arena meten en geeft ons dan een aanwijzing of angst mogelijk ook aangedaan is. Om het zeker te weten zou je dan een 'echte' angst test doen, maar dat is niet de insteek van dit project. Dus we nemen angst mee omdat het kan. En het zou zonde zijn om er niet naar te kijken. Laat ik het zo zeggen: we krijgen deze maat er 'gratis' bij.

Vraag 2 van de DEC-UM: De DEC is van mening dat het (mogelijk) effect van FA op activiteit niet los gezien kan worden van de verbetering in hartfunctie door FA in de dox-behandelde dieren. De DEC mist ook een wetenschappelijke onderbouwing/mechanisme: kan op basis van literatuur onderbouwd worden dat FA een onafhankelijk effect heeft op lichamelijke activiteit in het huidige model (wat is het veronderstelde mechanisme?). Met de huidige opzet kan de hypothese slechts eenzijdig getoetst worden, alleen indien de FA behandelde dieren géén verbetering laten zien van locomotor activity, is aangetoond dat FA geen effect heeft. Indien de dieren wel verbetering laten zien, zal aangetoond moeten worden dat dit onafhankelijk is van de verbetering in hartfunctie.

Antwoord verantwoordelijke onderzoeker vraag 2: Ik vermoed door deze vraagstelling te lezen dat de DEC onvoldoende op de hoogte is van de verschillen tussen acute en chronische doxo-geïnduceerde toxiciteit. Hierbij een toelichting: enkel bij chronische toediening van doxo treedt er een vermindering van hartfunctie op. Het zou in dat geval inderdaad moeilijk te onderscheiden of een verbetering van hartfunctie op zichzelf de verbetering in lichamelijke activiteit veroorzaakt. Echter, in DEC 2011-109 wordt enkel het acute model gebruikt, waar er dus geen vermindering is in hartfunctie, enkel een acute toxische reactie/irritatie. Bijgevolg is deze bemerking van de DEC wetenschappelijk incorrect.

Vraag 1 van de DEC-UM: Bij de alternatieven is niet overtuigend aangegeven, dat de doelstelling met behulp van dierexperimenteel onderzoek beantwoord moet worden. Mensgebonden onderzoek is een reëel alternatief dat eerst moet worden onderzocht. Dit weegt extra zwaar aangezien de dieren in het voorgestelde onderzoek ernstig ongerief wordt aangedaan.

Bovendien is de mechanistische, reductionistische aanpak, gezien de doelstelling 'menselijke gezondheid' en de te onderzoeken verschijnselen 'verminderde beweging en toegenomen angst bij kankerpatiënten', niet voor de hand liggend. Het gaat om complexe fenomenen die op uiteenlopende wijzen kunnen worden beïnvloed. Dan gaat het niet alleen om palliatieven en ondersteunende behandeling, zoals in de ethische afweging wordt gesuggereerd. Psychotherapie en fysiotherapie hebben bij angst en verminderde beweging wel degelijk erkende curatieve effecten. Misschien heeft ook foliumzuur een gunstig effect, maar dat kan via therapeutisch mensgebonden onderzoek worden aangetoond.

Antwoord verantwoordelijke onderzoeker vraag 1: Wij hebben begrip voor deze vraagstelling. Ik vermoed dat de DEC niet op de hoogte is van de extrapolatie van de dosis foliumzuur welke nodig is om dit effect te bekomen.

Toediening van 10 mg foliumzuur/d aan een muis komt overeen met een dagelijkse humane dosis rond de 1000 mg (range afhankelijk van extrapolatie 800-1200 mg/d). Dit is significant hoger dan de voedingssupplementen (o.a. ter voorkoming van NTD) van 500-100 microgram en van de 1-x-ige toedieningen als rescue therapie bij methotrexaat behandeling (75-200 mg). Mechanistisch werken deze behandelingen ook via andere wegen.

Doordat we dit effect op doxo-geïnduceerde complicaties enkel zien bij hoge dosis (en dus niet bij lage dosis) – en deze dosis als een geneesmiddel moet aanzien worden en dus niet als een voedingssupplement - moet volgens de wet op het geneesmiddelenonderzoek en de ethische toetsing dit eerst preklinisch getest worden. Ik kan hierbij uit ervaring spreken betreffende een gelijkaardige situatie m.b.t. de klinische infarctstudie. Bijkomend, gezien het unieke karakter van deze bevinding, werd dit door de UM gepatenteerd.

De onderzoeker wijst er tevens op dat bij borstkanker patiënten ook wel foliumzuur wordt gegeven. Een DEC-lid vraagt naar de dosis en de reden. De onderzoeker antwoordt dat het hier gaat om 200 mg foliumzuur en dat er geen direct therapeutisch effect wordt beoogd.

De DEC-UM zal een definitief besluit nemen tijdens de vergadering van 21 oktober 2011.

Aangaande de aangehouden protocollen (van dezelfde verantwoordelijke onderzoeker als project 2011-109) 2011-080/2011-081/2011-082/2011-083-2011-084 en 2011-085 deelt de Voorzitter haar nog het volgende mede:

- De protocollen hebben geleid tot veel vragen en opmerkingen door technisch, inhoudelijke en administratieve slordig- en onzorgvuldigheden. De aanvragen hebben de DEC disproportioneel veel tijd gekost om te behandelen.
- Er heeft een gesprek plaats gevonden met de verantwoordelijke onderzoeker, de Vicevoorzitter en één van de DEC leden, en dit heeft tot enige verbetering geleid, maar de aangehouden protocollen bevatten nog steeds onjuist- of slordigheden.
- De DEC wenst niet dat individuele leden van de DEC benaderd worden. Communicatie gaat via de ambtelijk secretaris van de DEC.
- De DEC wenst dat op- en aanmerkingen van de DEC zo correct en volledig mogelijk worden aangepast en pas daarna zal de aanvraag worden goedgekeurd. Dit in verband met de Wet Openbaarheid Besturen.

De Voorzitter dankt de verantwoordelijke onderzoeker voor haar komst.

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
26-10-2011

Betreft: Negatief advies project 2011-109.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Geachte

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

In de DEC vergadering van 21 oktober 2011 zijn DEC-protocol 2011-109, het verslag van de eerste bespreking daarvan in de DEC-UM, de verstuurde brieven en de inbreng van de verantwoordelijke onderzoeker tijdens de hoorzitting op 6 oktober 2011 besproken. De vergadering blijft na rijp beraad bij haar oordeel negatief te adviseren met betrekking tot project 2011-109.

Bezoekadres

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

De DEC baseert haar negatief advies op de volgende overwegingen:

- Het gekozen model lijkt niet geschikt genoeg voor het beantwoorden van de vraagstelling. De effecten van het gekozen model zijn zo uitgesproken dat de DEC ernstig twijfelt aan het voldoende onderscheidend vermogen om de mogelijke effecten van de interventie op angst en anxiety vast te stellen.
- De ethische afweging wordt ernstig beperkt door het ontbreken van bewijs/c.q. onderbouwing van het (mogelijke) mechanisme van foliumzuur wat betreft angst en anxiety in dit model voor cardiotoxiciteit.

In relatie tot dit punt, stelt de verantwoordelijke onderzoeker zelf vast bij protocol 2011-084, dat de gegevens van het nut van foliumzuur bij chemotherapie, niet geëxtrapoleerd kunnen worden naar de eNOS/cardiologie, omdat dit een totaal ander mechanisme is.

In verwijzing naar art 7.13 Reglement Dierexperimentencommissie
Universiteit Maastricht:

Wanneer de DEC-UM een negatief advies over een dierproef uitbrengt,
mag de dierproef niet worden uitgevoerd. Indien de Vergunninghouder
ondanks een negatief advies, de dierproef toch wil uitvoeren, is hij verplicht
het oordeel te vragen van de Centrale Commissie Dierproeven.
Dit oordeel is bindend.

Hoogachtend,

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Vicevoorzitter DEC-UM

Cc.