

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM Voorblad Versie 2006	DECNR: 2011-064 Ontvangen: 03-05-2011
Herziene versie	

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
28-05-2011	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	30981118N
----------------------	--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Bepaling van de biodistributie en targeting efficiëntie van annexine A5-ETA' in vivo.
--

startdatum 15 mei 2011
 einddatum ⁹ 15 mei 2014
 Duur van de proef¹⁰: 1,5 mnd

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	Biochemie
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art.12	
5. overige				Art.9	

Diergroep	1	2	3	4	5	6	
ctrl/exp/sham	Exp AnxA5-ETA'	Exp M1234-ETA'	Ctrl				
Diersoort	01	01	01				
Stam	NMRI nu/nu	NMRI nu/nu	NMRI nu/nu				
Construct / mutatie ?	geen	geen	geen				
Herkomst (leverancier) *	01	01	01				
Aantal	52	52	40				
Geslacht	m	m	m				
Dieren immuuncompetent ?	nee	nee	nee				
Leeftijd/gewicht	8 weken	8 weken	8 weken				
Doel van de proef *	30	30	30				
Belang van de proef *	01	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01				
Bijzondere technieken *	01	01	01				
Anesthesie *	04	04	04				
Pijnbestrijding *	04	04	01				
Mate ongerief *	05	05	05				
Toestand dier einde exp*	01	01	01				

1 Verantwoording

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

Titel: Bepalen van de biodistributie en targeting efficiëntie van annexine A5-ETA' *in vivo*.

1. Doel van de proef.

Fosfatidylserine (PS) is een biomarker van exponentieel groeiende tumoren. Tumorcellen onder stress en in apoptose brengen PS tot expressie. Annexine A5 bindt met hoge affiniteit aan PS. Deze eigenschap maakt annexine A5 geschikt als targeting molecuul om cytotoxische verbindingen specifiek naar tumoren te brengen. In DEC2010-185 hebben we de maximum tolereerbare dosis van annexine A5-ETA' bepaald. Hieruit is gebleken dat er tot een dosis van 100 µg annexine A5-ETA' geen toxische effecten waarneembaar zijn in de organen. In deze studie willen we de biodistributie en tumor killing efficiëntie van het fusie-eiwit onderzoeken *in vivo* bij een concentratie waarbij geen toxische effecten waarneembaar zijn (zoals bepaald in DEC-2010-185). Als tumor model kiezen we voor het HT-29 tumor model gezien dit een goed model is om PS getargete agents (zoals annexine A5-ETA') te testen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Kanker vormt een toenemend probleem in onze Westerse samenleving. Met het voorgestelde onderzoek willen wij een waardevolle bijdrage leveren aan de ontwikkeling van effectieve kanker therapie, waarbij toegenomen werkzaamheid wordt gecombineerd met een afname van bijwerkingen. Het uiteindelijke doel is therapie verbetering met vermindering van de subjectieve lijdensdruk van patiënten.

3. Alternatieven

Vervanging: er zijn gezien het huidige studiedoel geen alternatieven voor muizenproeven. Omdat wij juist geïnteresseerd zijn naar het effect van de anti-tumorbehandeling in een complexe omgeving nl. in de tumor in de *in vivo* context is *in vitro* onderzoek per definitie geen optie. De muis is de 'laagst' mogelijke diersoort waarbij dit onderzoek nog mogelijk én zinvol is, en vervanging door andere dieren is dus ook niet zinvol.

Vermindering: Om het aantal dieren zo klein mogelijk te kunnen houden, hebben we in een voorgaand onderzoek eerst de maximum tolereerbare dosis bepaald (MTD) met een niet letaal humaan eindpunt.

Verfijning: een uitgebreide *in vitro* studie en een voorafgaand *in vivo* experiment maakt dat dit *in vivo* experiment tot een verfijning kan leiden.

4. Ethische afweging

Hoewel er aan kanker jaarlijks tienduizenden mensen overlijden, bestaat er tot op heden geen klinisch succesvolle behandelingen die zowel de therapeutische efficiëntie als de bijwerkingen gunstig beïnvloeden. Een van de redenen hiervoor is dat er nog geen methoden zijn om therapeutische moleculen selectief op de plek van bestemming af te leveren. Wij onderzoeken een tumor-specifiek targeting molecuul en trachten de verbindingswijze met het behandelingsmolecuul te optimaliseren. Omdat ons onderzoek de basis zou kunnen vormen van effectieve behandelingen

voor een aandoening met grote individuele en sociale lijdensdruk, achten wij het huidige onderzoeksvoorstel ethisch verantwoord. Hierbij willen wij geen afbreuk doen aan de intrinsieke waarde van de proefdieren, en wij zullen te allen tijde proberen het noodzakelijk ongerief tot het minimaal noodzakelijke te beperken.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De ontwikkeling van antikanker therapie en met name chemotherapie heeft de laatste jaren niet stil gestaan. Echter, een aantal gebreken van een succesvolle toepassing van nieuwe antikanker behandelingen in de kliniek zijn te wijten aan de systemische toxiciteit van de chemotherapeutica en de lage therapeutische efficiëntie. Een methode om de systemische toxiciteit te verlagen is actieve targeting naar een specifieke plaats.

Een potentiële kandidaat voor actieve targeting in de tumor is annexine A5. Annexine A5 is een eiwit dat met hoge affiniteit bindt aan fosfatidylserine (PS), dat tot expressie wordt gebracht in exponentieel groeiende tumoren. We hebben het PS-bindend eiwit annexine A5 gefuseerd met het exotoxine ETA' op DNA niveau en vervolgens tot expressie gebracht en gezuiverd. Het exotoxine ETA' is een eiwit met cytotoxische eigenschappen dit d.m.v. een ADP-ribosylering van de elongatiefactor 2 in eukaryotische cellen.

In DEC2010-185 hebben we de

van annexine A5-ETA' bepaald.

Hieruit is gebleken dat er tot een dosis van 100 µg annexine A5-ETA' geen toxische effecten waarneembaar zijn in de organen. In deze studie willen we de biodistributie en tumor killing efficiëntie van het fusie-eiwit onderzoeken *in vivo* bij een concentratie waarbij geen toxische effecten waarneembaar zijn (zoals bepaald in DEC-2010-185).

Als tumor model kiezen we voor het HT-29 tumor model gezien dit een goed model is om PS getargete agents (zoals annexine A5-ETA') te testen. Als controle experiment voor de targeting functie maken we gebruik van het niet PS bindend eiwit M1234-ETA'.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is beoordeeld door de PI, nl. Overige zie voorblad , Art. 9 en goedgekeurd.

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

We willen het tumormodel HT29 colorectal cancer model in NMRI nu/nu muizen gebruiken voor het testen van de cytotoxiciteit van annexine A5-ETA'. We hebben gekozen voor nu/nu NMRI muizen omdat deze muizen zeer geschikt zijn om de groei en karakteristieken van een humane tumor *in vivo* te bestuderen. Dit is ook de meest gebruikte muis voor deze doeleinden in de literatuur. Deze muizen zullen geleverd worden door een van de regulier UM leveranciers (Charles River/ Harlan).

7b. Sexe

Het geslacht van de muizen is van belang voor deze experimenten. Omwille van hormonale verschillen tussen beide geslachten gebruiken we enkel mannelijke muizen.

7c. Aantallen

We willen de biodistributie en therapeutisch effect bepalen van annexine A5-ETA'. We willen dit onderzoeken in het tumor model HT29.

- De biodistributie zal onderzocht worden m.b.v. histologische analyses.
- Therapeutische efficiëntie wordt bepaald door meten van de tumorgroei m.b.v. een calliper.
- Histologische analyses op een bepaald tijdstip in tumorgroei/regressie

Biodistributie

Powerberekening:

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

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

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

De spreiding (σ) wordt geschat op 20 %. De variatie van toediening (IP)

Het beoogde effect (d) wordt geschat op 25 % (verschil in clearance/mL/minuut).

Dit geeft; $n = 15,7 * (20/25)^2 = 10,05$

Uitval ligt rond de 10% (toxiciteit)

Dus; $(a-0,1a) = 10,05 \Rightarrow 0,9a = 10,05 \Rightarrow a = 11,17 \Rightarrow 12$ dieren per groep

Aantal groepen = 2 (AnxA5-ETA' en M1234-ETA')

Aantal dieren per tumormodel: 2 groep x 12 = 24 dieren

Therapeutische efficiëntie

Powerberekening:

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

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

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

De spreiding (σ) wordt geschat op 18 %. Deze variatie komt voort uit de grote spreiding in de tumorgroei.

Het beoogde effect (d) wordt geschat op 25% (verschil in tumor heterogeniciteit).

Dit geeft; $n = 15,7 * (18/25)^2 = 8,13$

Uitval ligt rond de 10% (tumor take)

Dus; $(a-0,1a) = 8,13 \Rightarrow 0,9a = 8,13 \Rightarrow a = 9,03 \Rightarrow 10$ dieren per groep

Aantal groepen = 3 (annexine A5-ETA', M1234-ETA' en een niet behandelde controle groep)

Aantal dieren per tumormodel: 3 groepen x 10 = 30 dieren voor de therapeutische efficiëntie.

Histologische analyses**Powerberekening:**

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 18 %. Deze variatie komt voort uit de grote spreiding in de tumorgroei.

Het beoogde effect (d) wordt geschat op 25% (verschil in tumor heterogeniciteit).

Dit geeft; $n = 15,7 * (18/25)^2 = 8,138$

Uitval ligt rond de 10% (tumor take)

Dus; $(a-0,1a)=8,138 \Rightarrow 0,9a = 8,138 \Rightarrow a = 9,04 \Rightarrow 10$ dieren per groep

Aantal groepen = 3 (annexine A5-ETA', M1234-ETA' en een niet behandelde controle groep)

Aantal tijdstippen van opofferen = 3

Aantal dieren per tumormodel: 3 groepen x 3 tijdstippen x 10 = 90 dieren voor de histologische analyses.

Totaal aantal dieren: 24 + 30 + 90 = 144 dieren

6 Dierproef

8. Experiment

De te injecteren cellijn HT29 colorectaal carcinoma zijn gecontroleerd op de aanwezigheid van mycoplasma's en zijn hier vrij van. Het goedkeuringsnummer is Deze worden
geblindeerd subcutaan ($1.5 \cdot 10^6$ HT29) ingespoten tijdens fixatie van het proefdier ter verkrijging van een xenograft tumor. Metastasering van de tumoren is uit de literatuur erg onaannemelijk.

Biodistributie

Om de macrobiodistributie te bepalen van annexine A5-ETA' en M1234-ETA' worden 2 x 12 muizen gebruikt.

Groep 1 = annexine A5-ETA', opofferen 24 uur na injectie.

Groep 2 = M1234-ETA', opofferen 24 uur na injectie

Dag 0

$1.5 \cdot 10^6$ HT29 tumorcellen worden op dag 0 s.c. op de rechterflank ingespoten in een volume van 100 μ l fysiologisch zout. Vervolgens wordt de tumorgroei in de gaten gehouden.

Dag X (met een maximum van 20 dagen)

De muizen worden behandeld via IP injectie op de dag dat de tumor een doorsnede heeft van om en bij de 250 mm³.

Dag X+1

Opofferen van de muizen onder anesthesie d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV.

De organen en tumor worden verwijderd voor verdere histologische/toxicologische analyses.

Therapeutische efficiëntie

Om de therapeutische efficiëntie van annexine A5-ETA te bepalen worden 30 muizen gerandomiseerd over 3 groepen (annexine A5-ETA', M1234-ETA en een niet behandelde controle groep).

Dag 0

$1.5 \cdot 10^6$ HT29 tumorcellen worden op dag 0 s.c. op de rechterflank ingespoten in een volume van 100 μ l fysiologisch zout. Vervolgens wordt de tumorgroei in de gaten gehouden.

Dag X (met een maximum van 20 dagen)

Wanneer de tumor een volume van 200 mm³ heeft bereikt wordt de muis behandeld via IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' (75 μ g) of fysiologisch zout (ongerief 2):

Groep 1 = annexine A5-ETA'

Groep 2 = M1234-ETA' (niet-PS bindende vorm van annexine A5)

Groep 3 = controle groep

Dag X + 2

2^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' (75 μ g) of fysiologisch zout.

Dag X + 4

3^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' (75 μ g) of fysiologisch zout.

Dag X + 6

4^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' (75 μ g) of fysiologisch zout.

Dag X + 8

5^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' (75 μ g) of fysiologisch zout.

Om 2 dagen

Om de 2 dagen wordt de tumor groei gemeten met een calliper onder fixatie.

Het tumorvolume wordt dan berekend door gebruik te maken van de formule $A \times B \times C \times \pi/6$, omdat de tumoren elliptisch groeien.

Dag X + x

De behandeling is gestart bij een tumor volume van 200 mm^3 en de tumorgroei wordt opgevolgd tot 4x het startvolume. Wanneer de tumor een volume van 800 mm^3 bereikt heeft worden de muizen geëuthanaseerd d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV en de tumor en belangrijke organen (hart, long, milt, nier, lever) verwijderd voor verdere histologische/toxicologische analyses. Wanneer de tumor een volume van 800 mm^3 niet bereikt, worden de muizen na 4 weken opgeofferd.

Histologische analyses

Om de onderliggende oorzaak van de tumor behandeling te onderzoeken moeten we muizen opofferen op verschillende tijdstippen na injectie. Om dit histologische te kunnen analyseren worden 27 muizen gerandomiseerd over 3 groepen en 3 tijdstippen.

Dag 0

$1.5 \cdot 10^6$ HT29 tumorcellen worden op dag 0 s.c. op de rechterflank ingespoten in een volume van $100 \mu\text{l}$ fysiologisch zout. Vervolgens wordt de tumorgroei in de gaten gehouden.

Dag X (met een maximum van 20 dagen)

Wanneer de tumor een volume van 200 mm^3 heeft bereikt wordt de muis behandeld via een IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' ($75 \mu\text{g}$) of fysiologisch zout (ongerief 2):

Groep 1 = annexine A5-ETA'

Groep 2 = M1234-ETA' (niet-PS bindende vorm van annexine A5)

Groep 3 = controle groep

Dag X + 2

2^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' ($75 \mu\text{g}$) of fysiologisch zout.

Dag X + 4

3^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' ($75 \mu\text{g}$) of fysiologisch zout.

Dag X + 5

Opofferen $n = 3$ van iedere groep. De muizen worden geëuthanaseerd d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV en de tumor en belangrijke organen (hart, long, milt, nier, lever) worden verwijderd voor verdere histologische analyses.

Dag X + 6

4^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' ($75 \mu\text{g}$) of fysiologisch zout.

Dag X + 8

5^{de} behandeling: IP injectie met annexine A5-ETA' of M1234-ETA' ($75 \mu\text{g}$) of fysiologisch zout.

Dag X + 9

Opofferen $n = 3$ van iedere groep. De muizen worden geëuthanaseerd d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV en de tumor en belangrijke organen (hart, long, milt, nier, lever) worden verwijderd voor verdere histologische analyses.

Om de 2 dagen

Om de 2 dagen wordt de tumor groei gemeten met een calliper onder fixatie.

Het tumorvolume wordt dan berekend door gebruik te maken van de formule $A \times B \times C \times \pi/6$, omdat de tumoren elliptisch groeien.

Dag X + x

De behandeling is gestart bij een tumor volume van 200 mm^3 en de tumorgroei wordt opgevolgd tot 4x het startvolume. Wanneer de tumor een volume van 800 mm^3 bereikt heeft worden de muizen geëuthanaseerd d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV en de tumor en belangrijke organen (hart, long, milt, nier, lever) verwijderd voor verdere histologische/toxicologische analyses.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV

9b. Pijnbestrijding

De nu/nu NMRI muizen ontvangen de tumorcellen via een subcutane injectie. Naar verwachting en ervaring zullen de klachten hierdoor beperkt zijn en is pijnmedicatie niet noodzakelijk. Het subcutaan groeien van de tumor zal naar verwachting en ervaring niet leiden tot significante pijn.

De herhaalde IP injectie geven een hoog ongerief code ernstig (05) waardoor wij pijnbestrijding noodzakelijk achten. Carprofen 5mg/kg LG (werkingsduur ± 24 uur) wordt subcutaan toegediend 30 min voor toediening van het fusie-eiwit (AnxA5-ETA' en M1234-ETA'). Deze toediening wordt dagelijks herhaald tot einde van de proef.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Humane eindpunten:

- De dieren worden ge-euthanaseerd door cervicale dislocatie bij ziekte en wanneer de maximaal toegestane tumorlast wordt bereikt.
- Humane eindpunten waarbij euthanasie gebeurd zijn ziekte (vast te stellen door onderzoeker, proefdierversorger) en wanneer de maximaal toegestane tumorlast (2 cm³) wordt bereikt.
- Wanneer er open wonden bij sterk extern necrotiserende tumoren (fenomeen vnl. bij grotere tumoren) en wanneer er vocht lekt uit deze open wonde, wordt het proefdier onmiddellijk ge-euthanaseerd.
- Humane eindpunten zijn gebaseerd op een combinatie van gedrag en gewichtsverlies.
 - niet eten
 - buik over de grond
 - oedeemvorming (bolle buik en magere ruglijn)
 - paralyse
 - ernstig gewichtsverlies = 20 % verlies van de startwaarde
 - dehydratie

Gedragskenmerken:

- algemene indruk
- incoördinatie
- tremoren
- haren rechtop

Bij onduidelijkheden of mogelijke ziekte wordt contact opgenomen met art.14 functionaris. De euthanasie vindt d.m.v. cervicale dislocatie.

10a. Ongerief

Aard	Frequentie	Duur ongerief	Geschat ongerief
Tumor injectie	1-malig	< 1 min	Matig = 03
Tumorgroei		Max. 1,5 mnd	Gering = 01
<u>Biodistributie</u>			
Behandeling groep 1	1 keer	24 uur	Ernstig = 05
Behandeling groep 2	1 keer	24 uur	Ernstig = 05
<u>Therapeutische efficiëntie</u>			
Behandeling groep 1	5 keer/2dagen	Max 1,5 mnd	Ernstig = 05
Behandeling groep 2	5 keer/2dagen	Max 1,5 mnd	Ernstig = 05
Behandeling groep 3	5 keer/2dagen	Max 1,5 mnd	Ernstig = 05
<u>Histologie</u>			
Behandeling groep 1	5 keer/2dagen	Max 1,5 mnd	Ernstig = 05
Behandeling groep 2	5 keer/2dagen	Max 1,5 mnd	Ernstig = 05
Behandeling groep 3	5 keer/2dagen	Max 1,5 mnd	Ernstig = 05

De muizen worden behandeld met een chemotherapeuticum dat via IP wordt toegediend met herhaaldelijk injecties om de 2 dagen in een concentratie van 75 µg (ongerief ernstig = 05). Annexine A5-ETA's tot een concentratie van 100 µg niet toxische bevonden (eerdere studie (DEC-2010-185)).

10b. Welzijnsevaluatie

Een welzijnsevaluatie (ongerieflogboek) wordt bijgehouden.

11. Verzorging en huisvesting

De muizen worden sociaal gehuisvest volgens de Code of Practice in de I gedurende de behandeling en om de 2 dagen dagelijks zal de tumorgroei gemeten worden m.b.v. een caliper. Voer en dergelijke zijn standaard en gedurende het verblijf in de ... zullen ze gewoon door de medewerkers van het CPV verzorgd worden.

12. Deskundigheid

De tumorcel werkzaamheden worden door de V.O. uitgevoerd. De tumorgroei metingen en zullen door zowel door V.O. als Art. 12 deskundige uitgevoerd worden. Zij hebben hier respectievelijk de meeste ervaring mee.

13. Standard Operation Procedures (SOP)**1. Injectie tumorcellen, tumormetingen en imaging**

1.5 10^6 HT29 tumorcellen worden op dag 0 s.c. op de rechterflank ingespoten in een volume van 100 µl fysiologisch zout. Vervolgens wordt de tumorgroei in de gaten gehouden. Wanneer de tumor een volume van 200 mm³ heeft bereikt wordt de muis behandeld via een IP injectie (ongerief 2):

Om de therapeutische efficiëntie te bepalen wordt om de dag/2dagen de tumor groei gemeten met een calliper onder fixatie. De behandeling is gestart bij een tumor volume van 200 mm³ en de tumorgroei wordt opgevolgd tot 4x het startvolume. In totaal worden 5 behandelingen gegeven om de 2 dagen, startend bij een tumorvolume van 200 mm³. Wanneer de tumor een

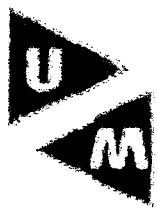
volume van 800 mm³ bereikt heeft worden de muizen geëuthanaseerd d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV en de tumor en belangrijke organen (hart, long, milt, nier, lever) verwijderd voor verdere histologische analyses.

Voor de biodistributie worden de muizen behandeld via IP injectie op de dag dat de tumor een doorsnede heeft van om en bij de 250 mm³ en 24 uur na injectie opgeofferd onder anesthesie d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV.

Voor de histologische analyses worden de muizen behandeld via IP injectie wanneer de tumor een volume van 200 mm³ bereikt heeft en de tumorgroei wordt opgevolgd en opgeofferd de dag na de 3^{de} en 5^{de} behandeling en als de tumor 4x het startvolume heeft bereikt. De muizen worden geëuthanaseerd d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG 1/10 verdund IP of IV en de tumor en belangrijke organen (hart, long, milt, nier, lever) worden verwijderd voor verdere histologische analyses.

Relevante literatuur

- 1 Allen, T.M. and Martin, F.J. (2004) *Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines*. *Semin. Oncol.*, 31, 5-15.
- 2 Fracasso, P.M., Blum, K.A., Tan, B.R., Fears, C.L., Bartlett, N.L., Arquette, M.A. and Clark, R.S. (2002) *Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin and gemcitabine in patients with advanced malignancies*. *Cancer*, 95, 2223-9.
- 3 Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, D. and Jain, R.K. (1994) *Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft*. *Cancer Res*, 54, 3352-6.
- 4 Kenis, H., van Genderen, H., Bennaghmouch, A., Rinia, H.A., Frederik, P., Narula, J., Hofstra, L. and Reutelingsperger, C.P. (2004) *Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry*. *J Biol Chem*, 279, 52623-9.



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, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Bepaling van de biodistributie en targeting efficiëntie van annexine A5-ETA 'in vivo'*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

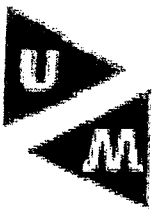
- De DEC verzoekt op het voorblad aan te passen dat de dieren **niet** immuuncompetent zijn.
- Bij punt 7b verzoekt de DEC het geslacht te vermelden.
- De DEC wil graag weten waarom de variatie die voort komt uit de spreiding van de tumorgroei, anders is bij de bepaling van groep 2 en 3.
- De DEC verzoekt de uitval voor alle drie de parameters aan te geven en te onderbouwen.
- De DEC vraagt zich af waarom de dieren uit het histologie experiment, niet gecombineerd kunnen worden met de dieren uit de therapeutische effect groep?

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 **2011-064**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



Antwoorden: DEC 2011-064

- De DEC verzoekt op het voorblad aan te passen dat de dieren **niet** immuuncompetent zijn.
Zie voorblad DEC-aanvraag.
- Bij punt 7b verzoekt de DEC het geslacht te vermelden.
Zie DEC-aanvraag.
- De DEC wil graag weten waarom de variatie die voort komt uit de spreiding van de tumorgroei, anders is bij de bepaling van groep 2 en 3.
De variatie die voortkomt uit de spreiding van de tumorgroep bij bepaling van de therapeutische efficiëntie is gelijk aan de spreiding van de tumorgroep bij bepaling van de histologische analyses maw die moet ook 18% zijn ipv 10%. Aanpassing van de getallen die zie DEC-aanvraag.
- De DEC verzoekt de uitval voor alle drie de parameters aan te geven en te onderbouwen.
Zie DEC-aanvraag.
- De DEC vraagt zich af waarom de dieren uit het histologie experiment, niet gecombineerd kunnen worden met de dieren uit de therapeutische effect groep?
Omdat de dieren van de therapeutisch effect groep tot eind van de proef in experiment blijven en de dieren voor histologie op bepaalde tijdstippen moeten opgeofferd worden, is het niet mogelijk om de dieren te combineren in 1 experiment.

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
30-05-2011

Project: *Bepaling van de biodistributie en targeting efficiëntie van annexine A5-ETA' in vivo.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM
T (043) .

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-064
Diersoort: muis
Aantal dieren: 144
Einddatum: 28-05-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM