

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC-UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-056

Ontvangen: 21-07-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
27-07-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	30982255B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

eNOS-uncoupling in the isolated myocyte

startdatum

01/05/2011

einddatum

30/04/2012

Duur van de proef¹⁰: 8d

Naam

Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)

E-mailadres

Bevoegdheid⁵ Cap. groep /afdeling

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

			Art.9	
			Art.9	
n/a				
			Wetenschappelijk beoordeelbaar. Vakgroepvoorzitter.	

Diergroep	1	2	3	4
	Group 1	Group 2a	Group 2b	Group 3a
Ctrl/exp/sham	Placebo(no FA, no BH4)	FA(1) 40mg/kg/d	FA(2) 400 mg/kg/d	BH4(1) 12 mg/kg/d
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	9	9	9	9
Geslacht	M	M	M	M
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja
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 *	01	01	01	01
Mate ongerief *	03	03	03	03
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

Diergroep	5	6	7	8
	Group 3b	Group 3c	Group 3d	Group 4
Ctrl/exp/sham	BH4(2) 36 mg/kg/d	BH4(3) 120 mg/kg/d	BH4(4) 200 mg/kg/d	FA+BH4 FA40mg/kg/d+BH4 36mg/kg/d
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	9	9	9	9
Geslacht	M	M	M	M
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja
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 *	01	01	01	01
Mate ongerief *	03	03	03	03
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

Titel: eNOS-uncoupling in the isolated myocyte

1. Doel van de proef.

In this study we will investigate uncoupling of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the isolated myocyte. Uncoupling of eNOS has been described to have a major role in the pathogenesis of heart failure (Takimoto) et al, 2005 and Moens et al, 2008). The myocardium consists of endothelial cells and myocytes. Until now, the main focus has been placed on oxidative stress and uncoupling in the endothelial cells. Moens et al (Circulation 2008) have found that upregulation of GTPCH, the rate limiting enzyme in the biosynthesis of BH4 (tetrahydrobiopterin, an essential cofactor of eNOS), only in the endothelial cells (and so not in the myocyte) did not have any protective effect, indicating an essential role of eNOS in the myocyte. Therefore, we will explore the whole eNOS-uncoupling pathway in the myocyte using several in vitro molecular and cellular assays. For this, we need isolated myocytes from animals treated with placebo or with an eNOS modulator (folic acid and/or BH4).

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



- 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, we demonstrated that specifically targeting eNOS uncoupling induced ROS generation is a new therapeutic strategy to reverse pressure-overload induced heart failure (Circulation Moens et al., May 2008). Upon our knowledge, this new therapeutic concept is one of the few therapeutic possibilities to reverse decompensated ventricular remodeling.
- The scientific objective is to advance basic understanding of how these eNOS modulators interact with eNOS in myocardium and furthermore to target novel protein candidates which can be developed as therapeutic application in preclinical to benefit patients with heart failure.
- The novelty of this research project is based on an economically beneficial and safe strategy to re-couple uncoupled eNOS by using eNOS-modulators, which can not be obtained by regular antioxidants.
- This research is essential to investigate the role of eNOS-uncoupling and the therapeutic effect of eNOS modulators in the myocyte.

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 an ethical way to explore the role of eNOS modulators on eNOS-uncoupling. There are no alternatives for the use of mice in this project regarding eNOS-uncoupling.

4. Ethische afweging

Ventricular remodeling following myocardial infarction in heart failure is a terminal heart disease. We recently demonstrated that re-coupling of uncoupled eNOS does have a role in the ventricular remodeling reversing process. Therefore, better understanding of the exact mechanism of how and where eNOS modulators tackle eNOS uncoupling in the myocyte. The use of mice, the indicated numbers and the expected mortality are justified.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

In the cardiovascular system, the signaling molecule Nitric oxide (NO), which is produced by the enzyme endothelial NO synthase (eNOS), has a crucial role in maintaining normal 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 an inactive 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 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.

In this study, we will investigate the fundamental mechanism of how these novel modulators modulates functional eNOS dimer in cardiac myocytes by using different dose combinations of BH4 and FA.

6. Wetenschappelijke beoordeling

The scientific importance and necessity of this study (which is part of the VIDI-project) was conformed by the 'vakgroepvoorzitter'. Letter of : attachment.

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Mice, C57Bl6, Charles River, euthanasia (overdosis isoflurane).

7b. Sexe

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

7c. Aantallen

Animals needed to explore Hypothese:

Group 1a: WT, no FA, no BH4 for 7d -> n=6, uitval 30% becomes n = 9

Group 2a: WT, FA 40 mg/kg/d for 7d , -> n=6, uitval 30% becomes n = 9

Group 2b: WT, FA 400 mg/kg/d for 7d , -> n=6, uitval 30% becomes n = 9

Group 3a: WT, BH4 12 mg/kg/d for 7d , -> n=6, uitval 30% becomes n = 9

Group 3b: WT, BH4 36 mg/kg/d for 7d , -> n=6, uitval 30% becomes n = 9

Group 3c: WT, BH4 120 mg/kg/d for 7d , -> n=6, uitval 30% becomes n = 9

Group 3d: WT, BH4 200 mg/kg/d for 7d , -> n = 6, uitval 30% becomes n = 9

Group 4: WT, FA 40mg/kg/d+ BH4 36 mg/kg/d for 7d, -> n = 6, uitval 30% becomes n = 9

* drop outs is due to insufficient cell harvesting. We do realize that this is a high percentage, however this is our and others realistic drop-out percentage (KUL – Leuven, Johns Hopkins). The reason why this is high is not only the amount of cells which we can isolate, but also the quality of the isolated myocytes. For some experiments the quality of the isolated myocytes is not so important and only the quantity counts. For this particular project, the quality is very important.

Subtotal Hypothesis: n=72

Reading parameter ('Uitleesparameter'): eNOS monomer/dimer-blot -> gemiddeld 0,5

standaarddeviatie 0,125/delta 0,25/ N1 = N2 = 5,25 --> afgerond 6. De uitval is dan ook berekend op het afgerond getal.

Explanation of numbers/group (n=6/group):

Power calculation:

Group 1a: WT, no FA, no BH4 -> With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6. the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7(which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

Group 2a: WT, FA 40 mg/kg/d for 7d -> With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6. the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7(which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

Group 2b: WT, FA 400 mg/kg/d for 7d -> With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6. the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7(which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

Group 3a: WT, BH4 12 mg/kg/d for 7d -> With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6. the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7(which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

Group 3b: WT, BH4 36 mg/kg/d for 7d -> With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6. the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7(which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

Group 3c: WT, BH4 120 mg/kg/d for 7d -> With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6. the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7 (which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

Group 3d: WT, BH4 200 mg/kg/d for 7d > With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6 the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7 (which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

Group 4: WT, FA 40mg/kg/d+ BH4 36 mg/kg/d for 7d > With a power of 90% and a significance level of 5%, the Sach's formula yields a group size of 6. the estimated 30.0% drop out of 9 animals is 2.7 (which becomes 3) animals: so $9 - 3 = 6$

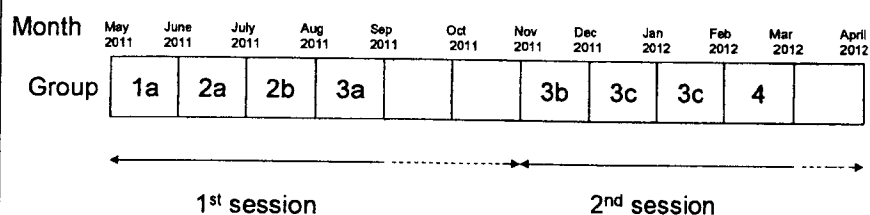
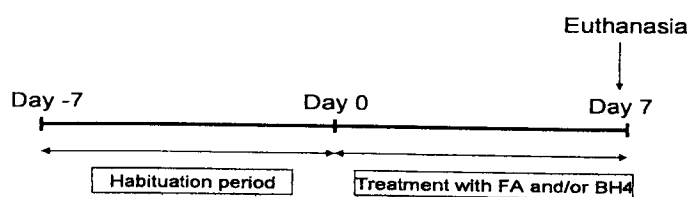
* drop outs is due to insufficient cell harvesting

Subtotal Hypothesis: $n = 72$

5 Dierproef

8. Experiment

C57Bl6 mice (n=62) will be feed with different dose combinations of FA and BH4 for 7 days (FA 40mg/kg/d, FA 400mg/kg/d, BH4 12 mg/kg/d, BH4 36 mg/kg/d, BH4 120 mg/kg/d, BH4 200 mg/kg/d, FA 40mg/kg/d+ BH4 36 mg/kg/d). Sacrifice of the animals will be achieved with an overdose of Isoflurane (5% or higher) in gas-chamber and the hearts will be collected for cellular and molecular analysis.



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

code 4 (overdose isoflurane)

9b. Pijnbestrijding

code 1. There is no reason to give analgesia, because the animal will immediately receive an overdosis of isoflurane.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Sacrifice of the animals will be achieved with an overdose of Isoflurane.

We do not expect any side effect of the drugs in the food of the healthy animal. Both BH4 and folates in these dosages are not reported to have any deleterious effect. So, we expect no problems and expect not to use the 'humane endpoints'.

In case we should use humane endpoints, we will use the humane endpoints used by the CPV:

Algemene humane eindpunten:

Bij een score of combinatie van scores gelijk of groter dan 2 dient het dier te worden geëuthanaseerd:

- Aanzienlijke afname van het lichaamsgewicht vastgesteld door het zichtbaar worden van ribben of ruggengraat (2).

- Abnormaal gedrag, bijvoorbeeld:

- Benauwdheid/hijgen (2)

- Salivatie (speekselvloed) (1)

- Niet reageren op prikkels (2)

- Aanhoudend (t)rillen (tremors) (2)

- Aanhoudend stuip trekken (convulsies) (2)

- Zelfverminking (2)

- Pilo erectie (opzetten van de haren) (< 24 uur: 1, > dan 24 uur: 2)

- Abnormale houding (1)

10a. Ongerief



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 overdose of isoflurane (5% or higher).

Total: Score 02

We do not expect any complications, we only feed them with regular mice-food (type transgenic dough, used in many animal facilities). We do not expect any form of cachexia at all.

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.

11. Verzorging en huisvesting

Transgenic dough diet, a complete diet, with folic acid/BH4, 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

s well-experienced with the cell-isolation technique and will do the full supervision

13. Standard Operation Procedures (SOP)

N/A

Relevante literatuur

Circulation. 2008 Apr 8;117:1810-1819

postbus 5800
6202 AZ Maastricht

telefoon
telefax

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

Maastricht, 4 juli 2011

Betreft: Projectnummer 2011-056

Directeur

Geachte

Hierbij bevestig ik, dat het project met
projectnummer 2011-056

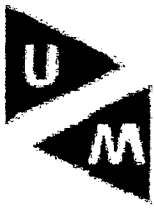
"eNOS-uncoupling in the isolated myocyte"

wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is.

In de hoop u voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Hoofd afdeling



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*eNOS-uncoupling in the isolated myocyte*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC merkt op, dat gezien het aantal dieren, dit geen pilot is en verzoekt dit op het voorblad bij "type aanvraag" aan te passen.
- De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC verzoekt bij punt 6 aan te geven door wie of welke commissie **dit DEC protocol** wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd en de PI op het voorblad te vermelden. De laatste 5 regels kunnen verwijderd worden, deze zijn niet relevant. Het attachment waar over geschreven wordt, ontbreekt.
- Bij punt 7c verzoekt de DEC aan te geven hoeveel cellen uit 1 muis gehaald kunnen worden en daarop dient de powerberekening gebaseerd te worden.
- De DEC verzoekt de uitval te berekenen over de oorspronkelijke groepsgrootte. De DEC merkt op dat de uitval erg hoog is ingeschat en wenst de motivering hierover; specifiek m.b.t de mogelijke oorzaken van kwaliteitsverlies van de cellen tijdens de isolatie en pogingen tot verfijning daarvan, om zo mogelijk een vermindering van het aantal dieren te kunnen bewerkstelligen.
- De DEC merkt op dat doden in het kader van de proef code 02 is.

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 2011-056, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Responses to questions from DEC regarding protocol DEC 2011-056

Question 1: De DEC merkt op, dat gezien het aantal dieren, dit geen pilot is en verzoekt dit op het voorblad bij "type aanvraag" aan te passen.

Response 1: Apologize for this typo, we have corrected this accordingly to 'new DEC protocol'.

Question 2: De duur van de proef op het voorblad is niet juist(dit is de langste periode binnen een project dat een dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.

Response 2: We changed the duration from 7d to 8d, apologies for this. The longest period that a mouse will be in this protocol is 8d (i.e. 7days of feeding period+1day isolation).

Question 3: De DEC verzoekt bij punt 6 aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd en de PI op het voorblad te vermelden. De laatste 5 regels kunnen verwijderd worden, deze zijn niet relevant. Het attachment waar over geschreven wordt, ontbreekt.

Response 3: I think that there is some confusion. The scientific importance of this project was judged by the international VIDJ-review board (not by a DEC-committee). We removed the 5 last lines.

The attachment (with the statement of the 'vakgroepvoorzitter') was handed to your administration office on March and afterwards confirmed by email. (In the future we will scan everything).

Question 4: Bij punt 7c verzoekt de DEC aan te geven hoeveel cellen uit 1muis gehaald kunnen worden en daarop dient de powerberekening gebaseerd te worden.

Response 4: From one adult mouse, we obtain around 100,000 cells, which is around 50ug total protein. We need exactly 40ug total protein for the monomer/dimer-visualization. It is a general accepted approach (Moens et al. Circulation 2008, Takimoto et al. JCI 2005, and previous DEC-protocols UM) to use (minimal) that 6 different mice for this visualization technique. No further power-analysis is possible.

Question 5: De DEC verzoekt de uitval te berekenen over de oorspronkelijk groepsgrootte. De DEC merkt op dat de uitval erg hoog is ingeschat en wenst de motivering hierover; Specifiek m.b.t de mogelijk oorzaken van kwaliteitsverlies van de cellen tijdens de isolatie en pogingen tot verfijning daarvan, om zo mogelijk een vermindering van het aantal dieren te kunnen bewerkstelligen.

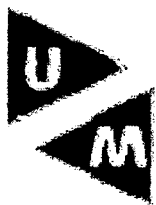
Response 5: We do realize that this possible drop-out is high. However, this is also in other labs. This is mainly because of the fragile structure of the myocyte and the high quality that is needed for our experiments (we can only use completely intact myocytes for this assay). Due to the study-design and science behind, we can not pool isolated myocytes. In the past, the group of _____ has spent an enormous amount of time to optimize the quality of myocyte isolations. The actions that we have taken to improve the quality of isolations are:

(i): We use exactly the same protocol as --

- (ii): We have meetings with [redacted] every 2 weeks, to discuss the quality and the progression of these experiments
- (iii): [redacted] has been on a scientific training to Leuven ([redacted]) to further improve quality of isolations and enhance her practical skills
- (iv): On a regular base, we have scientific contacts with the lab of [redacted] to further improve our quality.

Question 6: De DEC merkt op dat doden in het kader van de proef code 02 is.

Response 6: We have changed this accordingly and do apologize for this incorrectness.



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: 043 386 1100

Uw referentie:

Onze referentie:

Maastricht, 04-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*eNOS-uncoupling in the isolated myocyte*", is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

De DEC merkt op, dat de onderstaande vragen, al eerder gesteld door de DEC in zijn vergadering van 29-04-2011, nog niet bevredigend zijn beantwoord en verzoekt dit alsnog te doen:

- De DEC verzoekt bij punt 6 aan te geven door wie of welke commissie **dit DEC protocol** wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd en de PI op het voorblad te vermelden. De laatste 5 regels kunnen verwijderd worden, deze zijn niet relevant. Het attachment ontbreekt.
- De DEC verzoekt de uitval te berekenen over de oorspronkelijke groepsgrootte.
- De DEC verzoekt bij punt 9c de humane eindpunten aan te passen aan het model. Als men geen complicaties verwacht van het dieet, dan is het niet acceptabel om onder andere te wachten tot een dier cachectisch wordt (zo zwak is, dat het niet meer kan eten of drinken), met andere woorden "morbide" is. Als men wel complicaties verwacht dient men deze duidelijk te vermelden.

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

In verband met de redelijk late reactie van de DEC-UM en het feit dat de vergadering van juli 2 weken eerder is dan gepland, stellen wij u in de gelegenheid om uw herziene versie uiterlijk donderdag 7 juli in te leveren, zodat deze nog op de agenda geplaatst kan worden voor de vergadering van 15 juli aanstaande.

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 2011-056, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Vraag 1: De DEC verzoekt bij punt 6 aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd en de PI op het voorblad te vermelden. De laatste 5 regels kunnen verwijderd worden, deze zijn niet relevant. Het attachment ontbreekt.

Antwoord 1:

- I is toegevoegd aan het voorblad als wetenschappelijk beoordeelaar/vakgroepvoorzitter
- De 'laatste 5 lijnen' waren reeds verwijderd in de laatst ingediende versie
- Het 'attachment' was reeds eerder in papierenvorm aan het secretariaat van de DEC bezorgd (zie email communicatie). Een nieuwe digitale versie werd nu toegevoegd.

Vraag 2: De DEC verzoekt de uitval te berekenen over de oorspronkelijke groeps grootte.

Antwoord 2: Gemeente excuses voor deze irregulariteit. Om een groeps grootte te bekomen van $n=6$ en een dropout van 30% is de oorspronkelijke groeps grootte 9 (en dus inderdaad niet 8): $9-30\%=9-2.7 \rightarrow$ dit wordt: $9-3 = 6$. We hebben de aantallen op voorblad en aanvraag aangepast.

Vraag 3: De DEC verzoekt bij punt 9c de humane eindpunten aan te passen aan het model. Als men geen complicaties verwacht van het dieet, dan is het niet acceptabel om onder andere te wachten tot een dier cachectisch wordt (zo zwak is, dat het niet meer kan eten of drinken), met andere woorden "morbide" is. Als men wel complicaties verwacht dient men deze duidelijk te vermelden.

Antwoord 3:

Sorry voor deze onduidelijkheid. We verwachten inderdaad geen enkele neveneffect van deze drugs. We hebben dit duidelijker vermeld in het protocol. 'We do not expect any side effect of the drugs in the food of the healthy animal. Both BH4 and folates in these dosages are not reported to have any deleterious effect. So, we expect no problems and expect not to use the 'humane endpoints'.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

voorzitter

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Telefoon: +

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 19-07-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag: "*eNOS-uncoupling in the isolated myocyte*", is op de DEC vergadering van 15 juli 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 7c de onderbouwing van de aantallen in overeenstemming te brengen met de andere protocollen (berekening volgens statistiek met delta en sigma) en de uitval te berekenen over de **niet** afgeronde aantallen.
- Punt 9c- De DEC verzoekt de humane eindpunten te beschrijven passend bij dit experiment.

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 **2011-056**. gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoorden betreffende DEC 2011-056:

Uw vraag betreffende statistische onderbouwing aan te passen zoals in de andere projecten en de uitval te berekenen op de afgeronde getallen:

Dit werd aangepast in punt 7c

Uw vraag betreffende de humane eindpunten te vermelden.

Dit werd aangepast in punt 9c.

Uw bemerking betreffende

Dit werd verwijderd

Vriendelijke groeten

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
27-07-2011Project: *eNOS-uncoupling in the isolated myocyte.*DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO)

p/a secretariaat DEC-UM

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

Secretariaat DEC-UM

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-056

Postadres

Diersoort: muis

Postbus 616

Aantal dieren: 72

6200 MD Maastricht

Einddatum: 27-07-2015

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