

///

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC-UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-081

Ontvangen: 07-09-11

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
07-09-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³
n/a

LNV/CBDN R ⁴	

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

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

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

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

Titel van het onderzoek:

"Effect of eNOS-transcription enhancer AVE 3085 on lung ischemia reperfusion injury"

startdatum 01/08/2011

einddatum ⁹

1/02/2012

Duur van de proef ¹⁰: de maximale tijd van 1 experiment is 8d (7d pretreatment + max 6h I/R = 8d)

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

Diergroep	WT-sham surgery AVE3085 30 mg/kg/day GROUP 1	WT-1h ischemia, No reperfusion AVE3085 30 mg/kg/day GROUP 2	WT-1h ischemia, 1h reperfusion AVE3085 30 mg/kg/day GROUP 3	WT-1h ischemia, 5h reperfusion AVE3085 30 mg/kg/day GROUP 4	WT-1h ischemia, 5h reperfusion AVE3085 3 mg/kg/day GROUP 5	WT-1h ischemia, 5h reperfusion AVE3085 300 mg/kg/day GROUP 6
ctrl/exp/sham	Sham	exp.	exp	exp	sham	exp
Diersoort	mice	mice	mice	mice	mice	mice
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6
Construct / mutatie ?	no	no	no	no	no	no
Herkomst (leverancier) *	Charles River	Charles River	Charles River	Charles River	Charles River	Charles River
Aantal	6+1=7	6+1=7	6+1=7	6+1=7	6+1=7	6+1=7
Geslacht	male	male	male	male	male	male
Dieren immuuncompetent ?	yes	yes	yes	yes	yes	yes
Leeftijd/gewicht	10-12wk/ 22-24g	10-12wk/ 22-24g	10-12wk/ 22-24g	10-12wk/ 22-24g	10-12wk/ 22-24g	10-12wk/ 22-24g
Doel van de proef *	33	33	33	33	33	33
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01

Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01	01
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04
Pijnbestrijding *	04	01	04	04	04	04
Mate ongerief *	03	03	03	03	03	03
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM
2006)

(kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie

Titel: *Effect of eNOS-transcription enhancer AVE3085 on lung ischemia reperfusion injury*

1. Doel van de proef

Nitric oxide (NO) plays an important role in endothelial function and impaired NO production is involved in lung ischemic reperfusion injury. Therefore, compounds that regulate endothelial NO synthase (eNOS) may be of therapeutic benefit. A novel, low molecular weight compound AVE3085 is a recently developed compound with the ability to enhance eNOS transcription. The present study investigates the effects of AVE3085 on eNOS-uncoupling, which is a new pathogenetic mechanism of lung IR.

The present study will investigate the effects of AVE3085 on eNOS-uncoupling (=primary endpoint) with subsequent effects on endothelial dysfunction, superoxide generation and cell damage associated with lung ischemic reperfusion injury (=sec endpoints). Our previous experiments (DEC 2010-103) have identified eNOS uncoupling as a major player in the pathogenesis of lung IR and will further use this important 'biomarker of oxidative stress' as the primary endpoint and reading parameter of this study".

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Lung ischemia reperfusion injury may occur in at least 2 groups of patients: 1) patients with lung or heart surgery in which part or entire pulmonary circulation need to be temporarily interrupted (eg. by heart-lung machine); 2) patients with transplanted lung (the lung needs to be removed from a donor and then transported, and therefore is vulnerable to ischemic reperfusion injury). Ischemic reperfusion injury can cause complications such as impaired vascular reactivity, pulmonary edema, and death. Our group has already shown that the eNOS has a role in the pathogenesis of ischemic reperfusion injury in the heart and that modulation of eNOS has a protective effect on the heart muscle (Moens et al Circulation 2010). We suggest that eNOS-uncoupling, which is characterized by the dysfunction of the enzyme, also plays an important role during the onset of ischemic reperfusion injury in the lung and that eNOS enhancers, such as AVE3085, may have a preventive effect on this.

3. Alternatieven

Other alternatives such as cell culture and human tissue have been considered. However, cell culture does not represent lung ischemic reperfusion injury in in vivo situation. The isolated cells will behave differently from cells in their natural environment. The use of human tissue is not possible since it is not ethical to induce ischemic reperfusion injury in human. The animal experiments (mice) are therefore required to investigate our hypothesis.

4. Ethische afweging

Lung ischemia reperfusion injury is a complication occurred after various medical procedures. Lung transplantation procedure may introduce ischemic reperfusion injury which may lead to graft rejection. Even with the advancements in lung preservation, immunosuppression, and perioperative management, 15% of the patients undergoing lung transplantation still experience graft complications due to this injury. Other events, such as cardiopulmonary bypass, trauma, resuscitation for circulatory arrest, atherosclerosis, and pulmonary embolism, are also associated with ischemic reperfusion injury and contribute to the high morbidity and mortality rates in these patients. Identification of a new therapeutic way might be beneficial for patients. Therefore, the advantage for the society outweighs the discomfort that may be introduced to the experimental animals.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Ischemia reperfusion is a double-edged sword. In one hand reperfusion is necessary to revascularize ischemic tissue, but on the other hand it may induce ischemic reperfusion injury which contributes to oxidative stress with consecutive organ damage. Oxidative stress is the imbalance between reactive oxygen species (ROS, mainly superoxide) and intrinsic antioxidants activity. Superoxide can be generated when eNOS is uncoupled. We have shown that during ischemic reperfusion injury in the heart, superoxide is produced from the uncoupled eNOS which is considered as an important player on the onset of ischemic reperfusion injury. We have evidence that during ischemic reperfusion injury in the lung, eNOS uncoupling occurs and thus modulation of eNOS uncoupling by administration of compounds that regulate endothelial eNOS may be of therapeutic benefit. Tetrahydrobiopterin is one of the most potent modulator of eNOS. It has been shown to prevent eNOS uncoupling in several cardiovascular pathologies. However, this compound is unstable to light and temperature, has biphasic dose-response, and is expensive. Therefore, we are going to explore the role of another eNOS modulator, namely AVE3085 which is an eNOS transcription enhancer, in lung ischemic reperfusion injury.

Objectives: The present study will investigate the effects of AVE3085 on eNOS-uncoupling (=primary endpoint) with subsequent effects on endothelial dysfunction, superoxide generation and cell damage associated with lung ischemic reperfusion injury (=sec endpoints). Our previous experiments (DEC 2010-103) have identified eNOS uncoupling as a major player in the pathogenesis of lung IR and will further use this important 'biomarker of oxidative stress' as the primary endpoint and reading parameter of this study".

Explanation for the necessity for all groups:

- Dosages: We need a limited dose-response relation (30 mg/kg/d, 1/10th lower and 1/10th higher) to exclude a dangerous bimodal response with subsequent narrow therapeutic window. This has major importance for the translation to the clinic. This is equal as in the myocardium with another eNOS modulator (Moens et al. JMCC, 2011).
- Different stages of reperfusion-injury: This is highly relevant for the extrapolation to the clinic (short reperfusion is a model of the limited IR-injury after e.g. thoracic surgery, while longterm reperfusion is a model of longterm reperfusion-injury e.g. during lung transplantation).

We would like to accentuate that none of the animals awakes from this protocol and that each animal after the reperfusion is immediately euthanized.

6. Wetenschappelijke beoordeling

This DEC is scientifically reviewed and approved by the ,
annex). This DEC is never rejected by another DEC.

department chairman

(approval see

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort: mice

Stam: C57Bl/6

Herkomst: Charles River

Eindbestemming: mouse will be euthanized in anesthetized state after ischemia-reperfusion injury by taking out the lungs

7b. Sexe

We only use male mouse since including female mouse may introduce more variation to our experiment. In addition, female produces estrogen which is considered to have an influence on NO production from eNOS. We are very interested in the gender difference regarding ischemic-reperfusion in in female model and its relation with eNOS-uncoupling, and will investigate this in a separate project (together with Charite University, Berlin).

7c. Aantallen

Voor in eNOS uncoupling (read-out parameter) weten we uit gepubliceerde resultaten (Moens, Circulation 2008):

Delta = 0.25 en Sigma 0.15

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

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

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

De spreiding (σ) wordt geschat op 0.15%. Het beoogde effect (d) wordt geschat op 0.25%.

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

Echter, uitval is 10%

$(a - 0,1a) = 5.652$ of $0.9a = 5.652$ of $5.652/0,9 = a$

Dus $a = 6.28 \rightarrow$ afgerond dus $n = 7$

De Uitval:

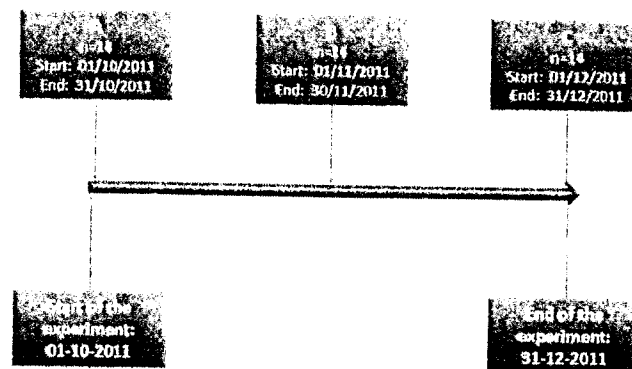
The dropout rate per peri-operative procedure is <10%. This is based on our previous DEC (2010-103). Theoretically it is considered as up to 0.7 animals per group. There are 6 groups, each with 7 animals. Therefore, in total there are 42 animals.

8. Experiment

The detail of the experiment is as following:

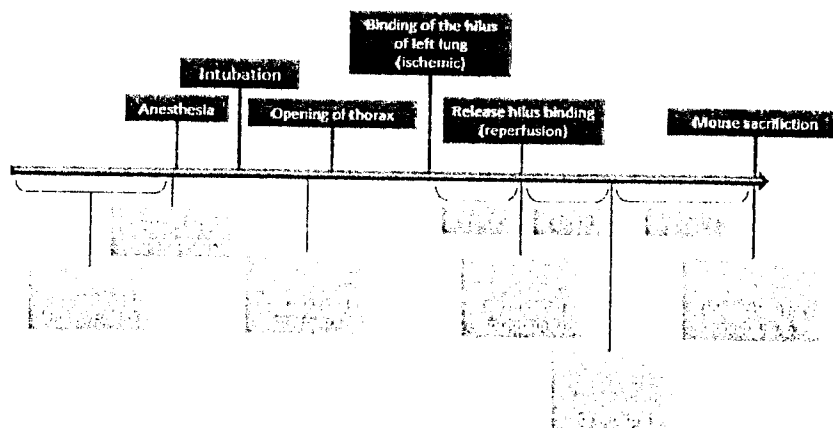
Group	1	2	3	4	5	6
WT/Transgenic	WT	WT	WT	WT	WT	WT
AVE 3085 concentration	30 mg/kg/d	30 mg/kg/d	30 mg/kg/d	30 mg/kg/d	3 mg/kg/d	300 mg/kg/d
Ischemia/Reperfusion	No (sham)	1 hr / -	1 hr / 1 hr	1 hr / 5 hrs	1 hr / 5 hrs	1 hr / 5 hrs
n total	6+1=7	6+1=7	6+1=7	6+1=7	6+1=7	6+1=7
Randomization group	A	B	C	A	B	C
Planning	01/10/2011 - 31/10/2011	01/11/2011 - 30/11/2011	01/12/2011 - 31/12/2011	01/10/2011 - 31/10/2011	01/11/2011 - 30/11/2011	01/12/2011 - 31/12/2011

Experimental planning scheme:



Before the animals are involved in the experiment, they will be acclimatized for 7 days in animal facility. Afterwards, the animals will be pretreated with AVR3085 for another 7 days preceding the surgery. The surgery will start with anesthesia of the animal followed by tracheal intubation to connect the respiratory tract with the ventilator. Subsequently, an incision will be made right under the xyphoid protuberance to access the thoracic cavity. The hilus of the left lung will be exposed and clamped to block the bloodflow, thus introduce ischemia to the left lung. Animals in group 1 will not undergo this procedure and, therefore will be sacrificed right after the thoracic cavity is assessed.

One hour after ischemia, the clamp will be released to allow blood flowing back to the lung, thus introduce reperfusion injury. Animal in group 2 will not undergo this procedure and will be sacrificed right at the end of ischemia is introduced. Animals in group 3 will be sacrificed 1 hour after the commencement of reperfusion, whereas animals in group 4, 5, and 6 will be sacrificed after 5 hours reperfusion. When sacrificed, the lungs will be harvested and frozen in liquid nitrogen before being kept in -80C.



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesia is 60mg/kg pentobarbital (Nembutal ®, Sanofi, Brussels, Belgium) administered intraperitoneally. In addition morphine 2.5 mg/kg LG will be used as premedication and will be given every 1.5 h perioperative. There is no need for post-operative medication because the animal will be euthanized at the end of the reperfusion period. For the long-term experiments (group 4, 5 and 6), an extra bolus of pentobarbital will be given after 1.5h.

9b. Pijnbestrijding

Subcutaneous morphine injection (0.2 mg) will be administered as a premedication and immediately after reperfusion or 2.5 hours after initiation of reperfusion (this later in the case of a 5h reperfusion-period). There is no need for post-operative analgesia because all the animals will be euthanized at the end of reperfusion (without awaking from the protocol).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasia: isoflurane overdose (short-term use of isoflurane for euthanasia has no effect on the endothelium and thus can be used without endangering the outcome of the study).

Human endpoints: During the experiment, the euthanasia will be preceded if the animal experiences acute distress. Acute distress is defined by forced/pumping respiratory and/or cyanosis of the mucosal.

Zorg

10a. Ongerief



Open thoracic surgery will be performed to introduce lung ischemic reperfusion injury (score 03). This procedure will be applied only one time in each animal. The total duration of surgery is up to 5 hours + 1 hour ischemia reperfusion, making a maximum total of 6 hours.

Administration of study medication (AVE3085 3, 30, and 300 mg/kg/d) will introduce no discomfort. Medication will be mixed in dough from transgenic BioServ (Moens et al Circ 2008, Takimoto et al JCI 2006 etc).

10b. Welzijnsevaluatie

There is no previous study that investigated the role of AVE 3085 on eNOS modulation after lung ischemic reperfusion injury.

11. Verzorging en huisvesting

Housing : Animals will be housed in groups of 2-3 animals/cage. Water and food ad libitum with cage enrichment in CPV.

Contact-person: _____ and _____

12. Deskundigheid

____ (Art. 9 and PI), _____ (Art. 9), and _____ (Art.9) have an experience

to lead the conductance of this experiment. -
perform the surgery.

(Art.12) is a well-trained animal technician to

13. Standard Operation Procedures (SOP)

See appendix 3

Relevante literatuur

Appedix 1: invited review (American Journal of Physiology) "Lung ischemia/reperfusion-injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. By Willem A. den Hengst, Jan F. Gielis, Judy Y. Lin, Paul E. Van Schil, Leon J. De Windt, An L. Moens"

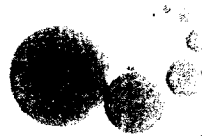
Appendix 2: AVE3085, an enhancer of endothelial nitric oxide synthase, restores endothelial function and reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. By Qin Yang, Hong-Mei Xue, Wing-Tak Wong, Xiao-Yu Tian, Yu Huang, Stephen KWT sui, Patrick KS Ng, Paulus Wohlfart, Huige Li, Ning Xia, Silke Tobias, Malcolm John Underwood, and Guo-Wei He

Appendix 3: SOP lung ischemic-reperfusion protocol (incl. anesthesia).

academisch ziekenhuis
Maastricht

P. Debyelaan 25
postbus 5800
6202 AZ Maastricht

telefoon 043-387 27 27
telefax 043-387 51 04



Hart en Vaat Centrum

azM

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

Maastricht, 6 juli 2011

Betreft: Projectnummer 2011-081

Directeur:

Geachte r

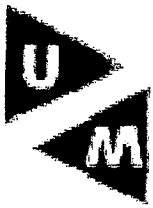
Hierbij bevestig ik, ... , dat het project met
projectnummer 2011-081

*"Effect of eNOS-transcription enhancer AVE 3085 on lung ischemia
reperfusion injury"*

wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is.

In de hoop u voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 05-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effect of eNOS-transcription enhancer AVE 3085 on lung ischemia reperfusion injury*", is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

Algemene opmerking:

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

Vervolgens heeft de DEC de volgende vragen en opmerkingen:

- Bij punt 4 verzoekt de DEC "will be" aan te passen in "may be".
- Het doel van het wetenschappelijk onderzoek, zoals beschreven onder punt 5, is het voorkomen van IR geïnduceerd longschade, daarom dient de primaire parameter, waarop de proeven berusten, een uitleesmaat voor de longschade te zijn en niet eNOS koppeling. Daarnaast wijst de DEC erop dat dieren per definitie niet wakker worden uit euthanasie!
- Bij punt 6 verzoekt de DEC te vermelden dat "**This DEC proposal (2011-081)** is reviewed and approved by..". De DEC wenst een gesigioneerde brief van | met vermelding van het DEC protocol nummer en geen kopie van de brief.
- Bij punt 7c wenst de DEC de onderbouwing van N=6. Er wordt verondersteld dat de uitkomst van de power analyse uitkomt op 6. De DEC verzoekt de berekening, welke gebaseerd is op de spreiding en beoogd effect, toe te voegen.
- De DEC wenst de motivering voor 10% uitval (is dit gebaseerd op historische data van experimenten uitgevoerd in Maastricht?).
- Voor een goed wetenschappelijk onderzoek is een statische berekening vereist, voor zowel het experimenteel design, als de analyses. Dit is onafhankelijk van de eisen van wetenschappelijke tijdschriften.

- De berekening van de uitval dient juist berekend te worden (op het originele aanvraagformulier van de DEC, zie website CPV, staat de juiste formule voor de berekening). Gezien dit meerdere keren is aangegeven is ter illustratie een voorbeeld toegevoegd. Als uit de groepsgrootte een n van 10 blijkt. Een uitval van 50% wordt verwacht. Voorbeeld foute berekening. $10 * 1,5 = 15$ dieren. Bij sterfte van 50% blijven er 7,5 dieren over. Dus een tekort aantal dieren. Voorbeeld juiste berekening. $10/0,5 = 20$ dieren. Bij sterfte van 50 blijven er 10 dieren over.
- Bij punt 7c- in het schema staan typefouten, te weten: $66=1=7$. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- DEC merkt op dat omwille standaarddeviatie te beperken het wellicht beter zou zijn de proef in een kort tijdbestek af te ronden.
- Met betrekking tot de verschillende dosissen, vraagt de DEC zich af of deze informatie over het bimodale effect, gehaald kan worden uit DEC 2011-080.
- Punt 9a- De DEC verzoekt een afdoende anesthesie te gebruiken. De DEC verzoekt een keuze te maken. Kies een stabiele anesthesie die alle 4 de peilers borgt en voldoende lang werkt. Noch pentobarbital, noch avertin, geeft een chirurgische anesthesie voor 1 uur. Mono-anesthesie heeft in principe geen voorkeur. Als inhalatie niet gebruikt kan worden, dan CRI (constant rate infusion) anesthesie. Tenzij je kiest voor urethaan. Geef premedicatie met een opiaat, zodat analgesie gedurende de operatie is gewaarborgd (dus al vóór de inductie van de anesthesie) als je een anestheticum (of combinatie ervan) kiest die niet analgetisch werken.
- Bij punt 10a merkt de DEC op dat als alle handelingen onder narcose geschieden en deze adequaat is, het ongerief code 02/03 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 2011-081, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Vraag 1: Bij punt 4 verzoekt de DEC "will be" aan te passen in "may be".

Antwoord 1: 'Will be' is vervangen door 'might be'.

Vraag 2: Het doel van het wetenschappelijk onderzoek, zoals beschreven onder punt 5, is het voorkomen van IR geïnduceerd longschade, daarom dient de primaire parameter, waarop de proeven berusten, een uitleesmaat voor de longschade te zijn en niet eNOS koppeling. Daarnaast wijst de DEC erop dat dieren per definitie niet wakker worden uit euthanasie!

Antwoord 2: - We begrijpen de verwarring die ontstaan is en hebben de doelen van deze DEC helderder geformuleerd in punt 1 en in punt 5: "The present study will investigate the effects of AVE3085 on eNOS-uncoupling (=primary endpoint) with subsequent effects on endothelial dysfunction, superoxide generation and cell damage associated with lung ischemic reperfusion injury (=sec endpoints). Our previous experiments (DEC 2010-103) have identified eNOS uncoupling as a major player in the pathogenesis of lung IR and will further use this important 'biomarker of oxidative stress' as the primary endpoint and reading parameter of this study".

- Excuses voor de ongelukkige formulering. Dit is nu veranderd naar: 'We would like to accentuate that none of the animals awakes from the experiment and that each animals at the end of the reperfusion is immediately euthanized.'

Vraag 3: Bij punt 6 verzoekt de DEC te vermelden dat "This DEC proposal (2011-081) is reviewed and approved by..". De DEC wenst een gesigneerde brief van met vermelding van het DEC protocol nummer en geen kopie van de brief.

Antwoord 3: 'Review and approved ...' is vermeld in de aanvraag. Op vraag van de secr van de DEC worden deze brieven nu ingescand en is deze brief over deze dec als een digitale versie toegevoegd (bij een eerdere DEC is de 'originele papieren versie van zulke brief immers verloren gegaan in het DEC-proces). Tevens is als wetenschappelijk beoordeelaar/vakgroepvoorzitter toegevoegd aan het voorblad.

Vraag 4: Bij punt 7c wenst de DEC de onderbouwing van N=6. Er wordt verondersteld dat de uitkomst van de power analyse uitkomt op 6. De DEC verzoekt de berekening, welke gebaseerd is op de spreiding en beoogd effect, toe te voegen.

Antwoord 4:

Vraag 5: De DEC wenst de motivering voor 10% uitval (is dit gebaseerd op historische data van experimenten uitgevoerd in Maastricht?).

Antwoord 5: Dit is inderdaag gebaseerd op data van DEC 2010-103. We hebben dit toegevoegd aan de aanvraag.

Vraag 6: Voor een goed wetenschappelijk onderzoek is een statische berekening vereist, voor zowel het experimenteel design, als de analyses. Dit is onafhankelijk van de eisen van wetenschappelijke tijdschriften.

Antwoord 6: De 'eisen' van de wetenschappelijke tijdschriften zijn verwijderd. Statistische onderbouwing eNOS uncoupling visualisation: gemiddeld 0,5.

standaarddeviatie 0,125, delta 0,25, $N1 = N2 = 5,25 \rightarrow$ afgerond 6. Dit werd berekend
ion , statisticus.

Vraag 7: De berekening van de uitval dient juist berekent te worden (op het originele aanvraagformulier van de DEC, zie website CPV, staat de juiste formule voor de berekening). Gezien dit meerdere keren is aangegeven is ter illustratie een voorbeeld toegevoegd. Als uit de groepsgrootte een n van 10 blijkt. Een uitval van 50% wordt verwacht. Voorbeeld foute berekening. $10 * 1,5 = 15$ dieren. Bij sterfte van 50% blijven er 7,5 dieren over. Dus een tekort aantal dieren. Voorbeeld juiste berekening. $10/0,5 = 20$ dieren. Bij sterfte van 50 blijven er 10 dieren over.

Antwoord 7: Dank voor de info. We hebben dit als volgt geformuleerd: om een uiteindelijke groepsgrootte te bekomen van $n=6$. Dient de oorspronkelijke groepsgrootte 7 te zijn als de uitval 10% is: $7-10\% = 6$.

Vraag 8: Bij punt 7c- in het schema staan typefouten, te weten: $66=1=7$. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Antwoord 8: Deze typefouten werden aangepast. Excuses hiervoor.

Vraag 9: DEC merkt op dat omwille standaarddeviatie te beperken het wellicht beter zou zijn de proef in een kort tijdbestek af te ronden.

Antwoord 9: We bedanken de DEC voor deze suggestie. 4m is reeds een korte periode en wegens praktische redenen kan dit niet ingekort worden.

We moeten tevens rekening houden met 'onvoorziene omstandigheden' zoals mogelijke CPV-infecties, aanleverproblemen muizen etc. Hierdoor verkiezen wij de zeer korte periode van 4m te behouden.

Vraag 10: Met betrekking tot de verschillende dosissen, vraagt de DEC zich af of deze informatie over het bimodale effect, gehaald kan worden uit DEC 2011-080.

Antwoord vraag 10: Dit is niet mogelijk aangezien DEC 2011-080 zich focust op NOS-dependent oxidatieve stress in het myocardium (bevat myocyten) en DEC 2011-081 zich focust op oxidatieve stress in longweefsel (bevat geen myocyten). De uptake van moleculen zoals AVE3085 is afhankelijk van het weefsel.

Vraag 11: Punt 9a- De DEC verzoekt een afdoende anesthesie te gebruiken. De DEC verzoekt een keuze te maken. Kies een stabiele anesthesie die alle 4 de peilers borgt en voldoende lang werkt. Noch pentobarbital, noch avertin, geeft een chirurgische anesthesie voor 1 uur. Mono-anesthesie heeft in principe geen voorkeur. Als inhalatie niet gebruikt kan worden, dan CRI (constant rate infusion) anesthesie. Tenzij je kiest voor urethaan. Geef premedicatie met een opiaat, zodat analgesie gedurende de operatie is gewaarborgd (dus al vóór de inductie van de anesthesie) als je een anestheticum (of combinatie ervan) kiest die niet analgetisch werken.

Antwoord vraag 11: In overleg met dierenarts CPV (d 06/07/2011) werd volgend plan door beide partijen als aanvaardbaar gesteld en vermeld in aanvraag en SOP.

- premedicatie met morfine.
- Morfine dient te herhaald worden als experiment langer dan 2h duurt

- Pentobarbitaltoedieningen zullen herhaald worden tijdens het experiment
- In overleg met de dierenarts zullen evt. nieuwe alternatieven besproken worden en indien nodig teruggekoppeld worden aan de DEC.

Vraag 12: Bij punt 10a merkt de DEC op dat als alle handelingen onder narcose geschieden en deze adequaat is, het ongerief code 02/03 is.

Antwoord vraag 12: We hebben de ongerief code aangepast in punt 10a naar 02. Dit is tevens aangepast op het voorblad.



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: 043-1

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 19-07-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag: “: *Effect of eNOS-transcription enhancer AVE 3085 on lung ischemia reperfusion injury*”, is op de DEC vergadering van 15 juli 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Bij punt 7c merkt de DEC op dat de berekeningen van de aantallen nog steeds niet juist zijn. De DEC stelt vast dat er gerekend wordt met een power van 90%, echter in de tabel wordt met 80% gerekend. Indien hiervoor gekozen wordt dient dit onderbouwd te worden. Verder moet de uitval berekend worden over de niet afgeronde aantallen per groep. $N=6$ is niet de uitleesparameter.
- Punt 8 (vraag 9 van de DEC)- De DEC is **niet** akkoord met uw antwoord. Randomisatie van groepen is wetenschappelijk beter verantwoord.

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 2011-081, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Dear I

We thank you for your feedbacks on our DEC-protocol 2011-081. Here by we would like to response on the feedbacks.

Feedback 1:

Bij punt 7c merkt de DEC op dat de berekeningen van de aantallen nog steeds niet juist zijn. De DEC stelt vast dat er gerekend wordt met een power van 90%, echter in de tabel wordt met 80% gerekend. Indien hiervoor gekozen wordt dient dit onderbouwd te worden. Verder moet de uitval berekend worden over de niet afgeronde aantallen per groep. $N=6$ is niet de uitleesparameter.

Response 1:

Voor in eNOS uncoupling (read-out parameter) weten we uit gepubliceerde resultaten (Moens, Circulation 2008):

Delta = 0.25 en Sigma 0.15

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

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

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

De spreiding (σ) wordt geschat op 0.15%. Het beoogde effect (d) wordt geschat op 0.25%.

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

Uitval wordt geschat op 0%

Indien uitval 10%

$(a-0,1a) = 5.652$ of $0.9a = 5.652$ of $5.652/0,9 = a$

Dus $a = 6.28 \rightarrow$ afgerond dus $n = 7$

Feedback 2:

Punt 8 (vraag 9 van de DEC)- De DEC is **niet** akkoord met uw antwoord. Randomisatie van groepen is wetenschappelijk beter verantwoord.

Response 2:

We can support the opinion of the DEC and will randomize the animals among all the groups. In addition, we will shorten the period of the experiment to 3 months and have edited accordingly the time schedule.

Kind regards,

MD, PhD



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

Uw referentie:

Onze referentie : 1

Maastricht, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag: "*Effect of eNOS-transcription enhancer AVE 3085 on lung ischemia reperfusion injury*", is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt het voorbeeld van de berekening van de aantallen bij punt 7c te verwijderen, dit schept verwarringen.
- Tevens verzoekt de DEC de opmerking "uitval wordt geschat op 0%" te verwijderen. Dit is tegenstrijdig met de zin eronder "uitval is 10%".
- De DEC verzoekt bij de uitval de zin "However, in practice enzovoort" te verwijderen. Tevens merkt de DEC op dat $36 + 7$ niet 42 is!

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 **2011-081**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 07 September 2011

Dear Sir/Madam,

We thank you for your feedbacks on our DEC application 2011-081. Hereby we give our responses:

Feedback 1: De DEC verzoekt het voorbeeld van de berekening van de aantallen bij punt 7c te verwijderen, dit schept verwarringen.

Response 1: We have deleted this part.

Feedback 2: Tevens verzoekt de DEC de opmerking "uitval wordt geschat op 0%" te verwijderen. Dit is tegenstrijdig met de zin eronder "uitval is 10%".

Response 2: We have deleted this part.

Feedback 3: De DEC verzoekt bij de uitval de zin "However, in practice enzovoort" te verwijderen. Tevens merkt de DEC op dat $36 + 7$ niet 42 is.

Response 3: We have deleted this part and have edited the error (6 groups, each 7 animals makes $6 \times 7 = 42$).

Kind regards,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043Maastricht
08-09-2011

Project: *Effect of eNOS-transcription enhancer AVE 3085 on lung ischemia reperfusion injury.*

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
T (043)

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-081
Diersoort: muis
Aantal dieren: 42
Einddatum: 07-09-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM