

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC-UM⁸ Versie 2006 Herziene versie	DECNR: 2011-085 Ontvangen: 02-10-2011
--	--

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ²	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
21-10-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot		

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

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

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

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

Titel van het onderzoek:
 Effect of eNOS transcription enhancing on myocyte dependent ROS

startdatum	01/10/2011	einddatum ⁹	30/12/2012
------------	------------	------------------------	------------

Duur van de proef¹⁰: De langste termijn dat een dier in experiment is 8d (7d pretreatment + volgende dag experiment =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	n/a				
4. WB/punt 6					

Diergroep	1	2	3	4
	Group 1a	Group 1b	Group 1c	Group 1d
Ctrl/exp/sham	AVE3085 3 mg/kg/d for 1 day	AVE3085 3 mg/kg/d for 7days	AVE3085 3mg/kg/d + BH4 5mg/kg/d for 1day	AVE3085 3mg/kg/d + BH4 5mg/kg/d for 7 days
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 *	02	02	02	02
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01
* VHI-coderingen zie bijlage				
Diergroep	5	6	7	8
	Group 2a	Group 2b	Group 2c	Group 2d
Ctrl/exp/sham	AVE3085 30 mg/kg/d for 1 day	AVE3085 30 mg/kg/d for 7days	AVE3085 30mg/kg/d + BH4 5mg/kg/d for 1day	AVE3085 30mg/kg/d + BH4 5mg/kg/d for 7 days
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 *	02	02	02	02
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01
* VHI-coderingen zie bijlage				

	Group 3a	Group 3b	Group 3c	Group3d
Ctrl/exp/sham	AVE3085 300 mg/kg/d for 1day	AVE3085 300 mg/kg/d for 7days	AVE3085 300mg/kg/d + BH4 5mg/kg/d for 1day	AVE3085 300mg/kg/d + BH4 5mg/kg/d for 7 days
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 *	02	02	02	02
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

1 Verantwoording

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

Titel: Effect of eNOS transcription enhancing on myocyte dependent ROS

1. Doel van de proef.

Background:

Heart failure (HF) is a major cause of morbidity and mortality in the western world. Approximately 4.9 million Americans are diagnosed with HF (Roger et al, 2004), and 550 000 new cases each year (Levy et al, 2002). HF induced ventricular remodeling represents morphological, cellular and molecular changes that progress over time in response to the initiating event. Uncoupled endothelial NO synthase (eNOS) plays an import role in the pathogenesis of HF failure (Takimoto) et al, 2005 and Moens et al, 2008). eNOS is not only expressed in endothelial cells, but also in atrial and ventricular myocytes. previously reported that upregulating tetrahydrobiopterin (BH4) (=cofactor of eNOS) in endothelial cells is not protective (Moens et al. 2008). Very likely that myocardial eNOS has the crucial role. eNOS uncoupling induced reactive oxygen species (ROS) have been described to exert multiple effects relevant to the pathophysiology of ventricular remodeling (Grieve, 2003; Takimoto, 2005). AVE3085 is one of the two novel transcription enhancers of eNOS, which can increase eNOS protein expression and concomitantly maintain eNOS coupling.

Objectives/Endpoints:

Primary endpoint: Effect of eNOS-transcription enhancers on eNOS-coupling in the myocyte.
Secondary endpoints: When and how enter eNOS transcription enhancers the myocyte? Is the combination of eNOS-transcription enhancers with BH4 more beneficial to keep eNOS coupled in the myocyte?

Approach:

To approach this research questions C57Bl6 mice (n= 96) will receive different doses of AVE3085 (3, 30, 300mg/kg/d), with or without BH4 (5mg/kg/d) for two different time period (1day and 7days). At each time point, myocardium will be harvested for molecular analysis of eNOS-uncoupling, including the stoichiometric relation between BH4-levels and eNOS. Sources of superoxide will be analyzed using several inhibitors and western blotting for key molecules (such as Nox's) in the oxidative stress cascade.

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 this eNOS transcriptional enhancer interact with eNOS in myocardium and furthermore to target it as a novel protein candidate 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 increase eNOS production at transcriptional level and better couple uncoupled eNOS by using eNOS-modulators, which can not be obtained by regular antioxidants, with subsequent prevention and/or reversion of heart failure.

Thus, this research project will greatly amplify what can be accomplished by using eNOS-modulators to improve myocardial function, leading to even more exciting and novel advances and more rapid progress in translating this new knowledge into clinical treatments of heart failure.

3. Alternatieven

There is no change, reduction or adaptation possible of the actual study-design. Myocytes won't grow in culture medium. Thus, cell-culture is 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 AVE3085 on eNOS transcriptional level, uncoupling and re-coupling. So there are no alternatives for the use of mice in this project.

4. Ethische afweging

Ventricular remodeling following myocardial infarction in heart failure is a terminal heart disease. There are almost no therapeutical options to reverse pre-existing heart failure. 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 AVE3085 effecting eNOS uncoupling in the myocyte is of enormous importance to tackle the failing heart. The use of mice, the indicated numbers and the expected mortality are justified.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Background: 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. Uncoupled endothelial NO synthase (eNOS) induced reactive oxygen species (ROS) have been described to exert multiple effects relevant to the pathophysiology of ventricular remodeling (Grieve, 2003; Takimoto, 2005). eNOS uncoupling plays an important role in the pathogenesis of HF failure (Takimoto et al, 2005 and Moens et al, 2008). Heart failure (HF) is a major cause of morbidity and mortality in the western world. Approximately 4.9 million Americans are diagnosed with HF (Roger et al, 2004), and 550 000 new cases each year (Levy et al, 2002).

Increasing evidence demonstrates an important pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiac hypertrophy and heart failure. AVE3085 is one of the two novel transcription enhancers of eNOS, which can increase eNOS protein expression and concomitantly maintain eNOS coupling. AVE3085 protects against I/R injury in porcine coronary small arteries endothelium through directly enhancing eNOS expression *in vitro* (Xue H, 2010). In spontaneously hypertensive rats, AVE3085 can improve endothelial function by its acute and chronic transcriptional enhancement of eNOS. eNOS and phosphorylated-eNOS protein levels were significantly higher in AVE3085-treated SHR compared to non-treated groups. Chronic treatment with AVE3085 significantly increased the expression level of eNOS and phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein (pVASP), cyclic GMP concentration in blood plasma and reduced intracellular and vascular cell adhesion molecules-1 (ICAM-1, VCAM-1) production (Riad A, 2008). AVE3085 attenuated cardiac hypertrophy and fibrosis in animals with diastolic ventricular dysfunction (Westermann D, 2009). Although pre-clinical studies for AVE3085 seem promising, more clinical data regarding the effectiveness or safety of these eNOS-enhancers is not yet available. 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 did not have any protective effect, indicating an essential role of eNOS in the myocyte.

Objectives/Endpoints: Primary endpoint: Effect of eNOS-transcription enhancers on eNOS-coupling in the myocyte. Secondary endpoints: When and how enter eNOS transcription enhancers the myocyte? Is the combination of eNOS-transcription enhancers with BH4 more beneficial to keep eNOS coupled in the myocyte?

Clarification of the need of the different groups (pharmacokinetic analysis):

All experiments will be done in isolated myocytes. Different dosages (3-30-300 mg/kg/d): To exclude a bimodal dose-response effect, and subsequently a small therapeutic window. The pharmacokinetics from eNOS modulators are different in the myocardium vs. the endothelium. And this study is looking even more in detail, it looks to a special cell type from the myocardium, i.e. the myocyte.

Different times: To determine if one single dosis (1d pretreatment) is ok, or do we need a longer dose uploading (as we see with other eNOS modulators

Combination with BH4: TO explore if this combo can increase the beneficial effect vs. Monotherapy
Therefore: all groups and subgroups are needed for this pharmacokinetic analysis.

Comment regarding dosage: Both myocytes and endothelial cells contain eNOS, which can uncouple. There is interaction between these celltypes regarding eNOS. This particular project focuses on the effect of eNOS transcription-enhancers in the isolated myocyte. The data from this study in isolated myocytes are independent of an in vivo situation where 1) these molecule can be uptaken by both endothelial cells and myocytes and 2) there is an interaction regarding eNOS uncoupling between endothelial cells and myocytes.

6. Wetenschappelijke beoordeling

- The scientific importance and necessity of this study (which is part of the -project) was reviewed and approved by the (approval see annex).
- 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

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

7b. Sexe

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

7.c. Aantallen

All 12 groups (1a-3d) will have 9 animals. The calculation of this is as follows:

Voor in eNOS uncoupling (read-out parameter, see endpoints page1) 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 30%

$0.7a = 5.652$

$a = 5.652 / 0.7$

$a = 8.074$

afgerond $n = 9$

So, the total $n = 12 \times 9 = 108$

Clarification of the need of the different groups (pharmacokinetic analysis):

Different dosages (3-30-300 mg/kg/d): To exclude a bimodal dose-response effect, and subsequently a small therapeutic window. The pharmacokinetics from eNOS modulators are different in the myocardium vs. The endothelium. And this study is looking even more in detail, it looks to a special cell type from the myocardium, i.e. **the myocyte**.

Different times: To determine if one single dosis (1d pretreatment) is ok, or do we need a longer dose uploading (as we see with other eNOS modulators

Combination with BH4: TO explore if this combo can increase the beneficial effect vs. Monotherapy

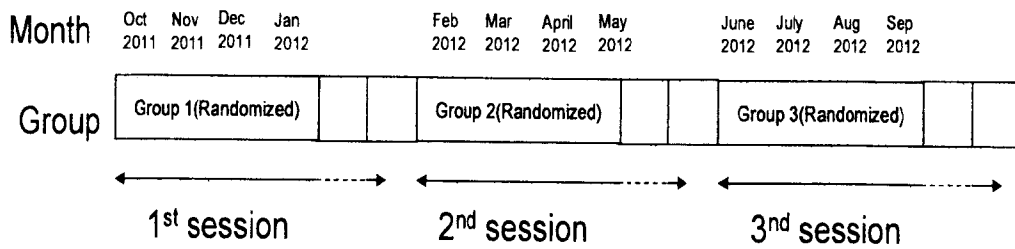
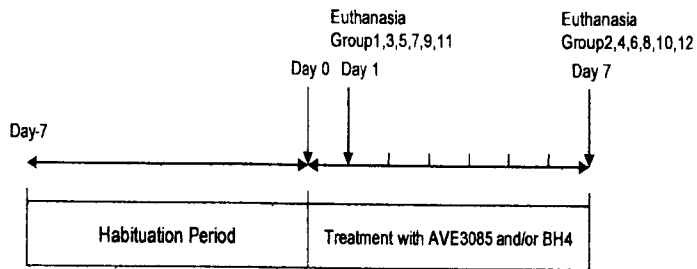
Therefore: all groups and subgroups are needed for this pharmacokinetic analysis.

Drop outs are due to insufficient cell harvesting. We do realize that this is a high percentage, however this is our and others realistic drop-out percentage. 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 (the cell needs to be completely intact otherwise eNOS uncouples already during the isolation procedure). We confirm that we do collaborate with the main-expert of isolated myocytes at this university, and have optimized our protocols with this group and have monthly joined meetings to discuss our isolations."

6 Dierproef

8. Experiment

C57Bl6 mice (n=96) will be fed with different dose combinations of AVE3085 and BH4 for 1 day or 7 days, (AVE3085 3mg/kg/d, AVE3085 30mg/kg/d, AVE3085 300mg/kg/d, BH4 5mg/kg/d). Sacrifice of the animals will be achieved with an overdose of Isoflurane (5% or higher) in gas-chamber and after the hearts are taken out, isolated myocytes 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 to use the human endpoints because in this type of experiments, the animals will only be fed with the drug (no side effects known, though their food) for 1 week and afterwards, they will be euthanized (with isoflurane) and afterwards, the hearts will be taken out and processed (to obtain isolated myocytes).

If for any reason we should perform euthanasia during the stabilisation and/or feeding (through food) period, we will use humane endpoint such as:

- **Weight loss:** loss of 20-25% or if not measured, characterized by cachexia and muscle wasting.
- **Inappetance:** complete anorexia for 24 hours or less than 50% of caloric requirement
- **Weakness/inability to obtain feed or water:** Inability or extreme reluctance to stand which persists for 24 hours
- **Moribund state:** measured by a lack of sustained purposeful response to gentle stimuli (example of purposeful response- weak attempt to get up; if animal is on its side, attempts should be asymmetrical in nature)
- **Infection:** infection involving any organ system (either overt, or indicated by increased body temperature or WBC parameters) which fails to respond to antibiotic therapy within an appropriate time and is accompanied by systemic signs of illness.
- **Signs of severe organ system dysfunction non-responsive to treatment, or with a poor prognosis as determined by an RAR veterinarian.**
Respiratory: dyspnea, cyanosis.
Cardiovascular: blood loss or anemia resulting in hematocrit below 20%
- **Gastrointestinal:** severe vomiting or diarrhea, obstruction, intussusception; peritonitis, evisceration (immediate euthanasia)

Zorg

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 overdosis 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. There are no data from related previous experiments that should be mentioned here.

11. Verzorging en huisvesting

Transgenic dough diet, a complete diet, with AVE3085/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

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

13. Standard Operation Procedures (SOP)

N/A

Relevante literatuur

Wolfhart P. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.2008.

An Moens. Circulation. 2008

Yang Q. Br J Pharmacol. 2011

Xue H. World journal of surgery, 2010.

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
Cardiologie

azM

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

Maastricht, 7 juli 2011

Betreft: Projectnummer 2011-085

Directeur:

Geachte

Hierbij bevestig ik,
projectnummer 2011-085

dat het project met

"Effect of eNOS transcription enhancing on myocyte dependent ROS"
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: 04:

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 05-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effect of eNOS transcription enhancing on myocyte dependent ROS*", 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:

- Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.
- De opmerking "Change data's: see comment in aanvraag" op het voorblad verzoekt de DEC te verwijderen.
- Punt 6- De DEC mist het attachment. De DEC wenst een gesigneerde brief van Prof. H. Crijns, met vermelding van het DEC protocol nummer (2011-085) en geen kopie van de brief.
- **Voor verder commentaar verzoekt de DEC de opmerkingen van project 2011-080 en 2011-081 te gebruiken en de aanvraag nog eens goed na te kijken en waar nodig te corrigeren.**

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

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

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-085, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Vraag 1: De DEC-UM ziet niet hoe de gekozen opzet van het onderzoek correspondeert met de doelstelling van dit onderzoek.

Antwoord 1: Deze doelstellingen zijn verduidelijkt in punt 1 en 5. o.a. werden de objectives duidelijker geformuleerd: **Objectives/Endpoints:** Primary endpoint: Effect of eNOS-transcription enhancers on eNOS-coupling in the myocyte. Secondary endpoints: When and how are eNOS transcription enhancers the myocyte? Is the combination of eNOS-transcription enhancers with BH4 more beneficial to keep eNOS coupled in the myocyte?

Vraag 2: Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.

Antwoord 2: Het ongerief is in overeenstemming gebracht en werd aangepast op het voorblad.

Vraag 3: De opmerking "Change data's: see comment in aanvraag" op het voorblad verzoekt de DEC te verwijderen.

Antwoord 3: Dit is verwijderd op het voorblad.

Vraag 4: Punt 6- De DEC mist het attachment. De DEC wenst een gesigneerde brief van _____, met vermelding van het DEC protocol nummer (2011-085) en geen kopie van de brief.

Antwoord 4: De brief is digitaal toegevoegd. Tevens is _____ vermeld op het voorblad als wetenschappelijk beoordeelaar.

Verder zijn volgende veranderingen aangebracht in de aanvraag en op het voorblad:

- correctie groeps grootte ifv dropout: Om een uiteindelijke groeps grootte van 6 te bekomen met een dropout van 30% moet de originele groeps grootte 9 zijn : $9 - 30\% = 9 - 2.7$ (i.e.3) = 6
- de statistische onderbouwingen van de aantallen werd toegevoegd.
- De noodzaak van eNOS-uncoupling als readingparameter werd in de objectives meer verduidelijkt

Vraag 1: De DEC-UM ziet niet hoe de gekozen opzet van het onderzoek correspondeert met de doelstelling van dit onderzoek.

Antwoord 1: Deze doelstellingen zijn verduidelijkt in punt 1 en 5. o.a. werden de objectives duidelijker geformuleerd: **Objectives/Endpoints:** Primary endpoint: Effect of eNOS-transcription enhancers on eNOS-coupling in the myocyte. Secondary endpoints: When and how are eNOS transcription enhancers the myocyte? Is the combination of eNOS-transcription enhancers with BH4 more beneficial to keep eNOS coupled in the myocyte?

Vraag 2: Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.

Antwoord 2: Het ongerief is in overeenstemming gebracht en werd aangepast op het voorblad.

Vraag 3: De opmerking "Change data's: see comment in aanvraag" op het voorblad verzoekt de DEC te verwijderen.

Antwoord 3: Dit is verwijderd op het voorblad.

Vraag 4: Punt 6- De DEC mist het attachment. De DEC wenst een gesigneerde brief van met vermelding van het DEC protocol nummer (2011-085) en geen kopie van de brief.

Antwoord 4: De brief is digitaal toegevoegd. Tevens is vermeld op het voorblad als wetenschappelijk beoordeelaar.

Verder zijn volgende veranderingen aangebracht in de aanvraag en op het voorblad:

- correctie groeps grootte ifv dropout incl. statistische onderbouwingen van de aantallen

Voor in eNOS uncoupling (read-out parameter, see endpoints page1) 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%

Uitval 30%

$0.7a = 5.652$

$a = 5.652 / 0.7$

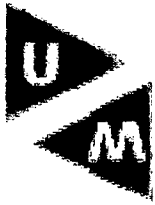
$a = 8.074$

afgerond $n = 9$

- De noodzaak van eNOS-uncoupling als readingparameter werd in de objectives meer verduidelijkt

-Randomisatie van de groepen (para.8)

-Ongerief en welzijnsevaluatie (10a en b) is aangevuld (conform DEC2011-056).



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 19-07-2011

Geachte Onderzoeker,

De herziene versies van uw aanvragen 2011-082/2011-083/2011-084 en 2011-085 zijn niet behandeld (dus nog aangehouden) tijdens de vergadering van 15 juli 2011.

De DEC verzoekt u eerst project 2011-080 en 2011-081 aan te passen.

De vragen gesteld bij deze projecten zijn ook van toepassing op de andere aanvragen en de DEC verzoekt dan ook deze aanvragen aan te passen.

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

De DEC verzoekt u niet te verwijzen naar personen (bijvoorbeeld Dit is voor de DEC niet relevant om te weten en in verband met de Wet-openbaarheid-van bestuur ook niet handig om te doen.

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

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

L. voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-...

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag: "*Effect of eNOS transcription enhancing on myocyte dependent ROS*", is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De zin bij punt 1 en 5 over de "secondary endpoints" is onduidelijk. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- Punt 7c. De DEC verzoekt: "Uitval wordt geschat op 0%" te verwijderen. Dit is tegenstrijdig met de zin eronder: uitval 30%.
- De DEC verzoekt de te lage kwaliteit van de geïsoleerde myocyten beter te beschrijven en welke pogingen zijn ondernomen om dit te verbeteren. De DEC brengt de onderzoekster onder de aandacht dat er bij meerdere onderzoeksgroepen binnen de UM cardiomyocyten worden geïsoleerd. Hier kan om advies gevraagd worden.
- De DEC vraagt zich af of de optimale dosis die naar voren komt uit dit experiment niet gebruikt kan worden voor DEC 2011-083. Verder merkt de DEC op dat als *in vitro* geen significant effect gevonden wordt, is het dan nog wel zinvol deze stof *in vivo* te onderzoeken (2011-083).
- Punt 7b. De zin "These results are not reliable enzovoort" is voor de DEC onduidelijk. De DEC verzoekt dit beter te verwoorden.

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 **2011-085**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoorden op vragen: DEC 2011-085

Vraag 1: De zin bij punt 1 en 5 over de "secondary endpoints" is onduidelijk. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Antwoord 1: Excuses voor het niet vermelden van het belangrijkste woord "enter": De zin werd nu als volgt aangepast: **When and how enter eNOS transcription enhancers the myocyte?**

Vraag 2: Punt 7c. De DEC verzoekt: "Uitval wordt geschat op 0%" te verwijderen. Dit is tegenstrijdig met de zin eronder: uitval 30%.

Antwoord 2: Dit werd verwijderd.

Vraag 3: De DEC verzoekt de te lage kwaliteit van de geïsoleerde myocyten beter te beschrijven en welke pogingen zijn ondernomen om dit te verbeteren. De DEC brengt de onderzoekster onder de aandacht dat er bij meerdere onderzoeksgroepen binnen de UM cardiomyocyten worden geïsoleerd. Hier kan om advies gevraagd worden.

Antwoord 3: Excuses dat wij dit onvolledig hebben toegelicht. Wij hebben - net zoals bij DEC 2011_056_ als volgt aangevuld: "Drop outs are due to insufficient cell harvesting. We do realize that this is a high percentage, however this is our and others - also at this university- realistic drop-out percentage . 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 (the cell needs to be completely intact otherwise eNOS uncouples already during the isolation procedure). We confirm that we do collaborate with the main-expert of isolated myocytes at this university, and have optimized our protocols with this group and have monthly joined meetings to discuss our isolations."

Vraag 4: De DEC vraagt zich af of de optimale dosis die naar voren komt uit dit experiment niet gebruikt kan worden voor DEC 2011-083. Verder merkt de DEC op dat als in vitro geen significant effect gevonden wordt, is het dan nog wel zinvol deze stof in vivo te onderzoeken (2011-083).

Antwoord 4: Het myocard bestaat uit myocyten (hartspiercellen) en endotheelcellen. Beide celltypes bevatten eNOS dat kan ontkoppelen. Er is interactie tussen deze celltypes betreft. Dit project focust op het effect van eNOS transcription enhancers op de geïsoleerde myocyte. Deze bevindingen - in de geïsoleerde myocyten - zijn niet afhankelijk van de in vivo setting waar 1) deze moleculen kunnen opgenomen worden door endotheelcellen en/of myocyten en 2) er interacties betreffende eNOS-ontkoppeling kunnen zijn tussen endotheelcellen en myocyten.

Vraag 5: Punt 7b. De zin "These results are not reliable enzovoort" is voor de DEC onduidelijk. De DEC verzoekt dit beter te verwoorden.

Antwoord 5: Excuses voor deze onduidelijkheid. We hebben dit aangepast als volgt: . It is known (e.g. Koricanac et al. Eur. J Pharmacol 2011) that the

estrogen signalling pathway interferes with cardiac eNOS. Therefore, we can not mix female and male results. We do realise that also investigation of the female isolated myocytes is important but this will be performed in a 2nd study by our collaborators

Met vriendelijke groeten,



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

Maastricht, 28-09-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag: "*Effect of eNOS transcription enhancing on myocyte dependent ROS*", is op de DEC vergadering van 23 september 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC merkt op dat vraag 1 niet is aangepast in de tekst en verzoekt dit alsnog te doen.
- De zin "uitval wordt geschat op %" is niet verwijderd en de DEC verzoekt dit alsnog te doen.
- Op het voorblad "overige uitvoerende" aanpassen in PI.
- Er zitten discrepanties in de vraagstelling. Met verbazing stelt de DEC vast dat het nog altijd onduidelijk is of de voorgenomen analyses worden verricht op het hele hart, op geïsoleerde cardiomyocyten of op geïsoleerde endotheelcellen. Onder de daarvoor bedoelde sectie "8 exp." is namelijk sprake van het complete hart, terwijl onder zowel 5 als 7, afwisselend melding wordt gemaakt van cardiomyocyten dan wel endotheelcellen. Aangezien dit ongetwijfeld gevolgen zal hebben voor de berekende groepsgrootte op basis van e-NOS coupling eist de DEC dat dit helder en zorgvuldig wordt vermeld.
- De beantwoording vraag 3 is akkoord, maar niet aangepast in het protocol, dit dient alsnog te geschieden.
- Vraag 4 is eveneens niet aangepast in het protocol.
- Vraag 5- punt 7b is ook niet aangepast.

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 **2011-085**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoorden op DEC 2011-085

Vraag 1: De DEC merkt op dat vraag 1 niet is aangepast in de tekst en verzoekt dit alsnog te doen.

Antwoord 1: enter werd toegevoegd bij punt 1 en 5.

Vraag 2: De zin "uitval wordt geschat op %" is niet verwijderd en de DEC verzoekt dit alsnog te doen.

Antwoord 2: is verwijderd bij punt 7

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

Antwoord 3: Bij is WB/Punt 6 toegevoegd en overige uitvoerende verwijderd.

Vraag 4: Er zitten discrepanties in de vraagstelling. Met verbazing stelt de DEC vast dat het nog altijd onduidelijk is of de voorgenomen analyses worden verricht op het hele hart, op geïsoleerde cardiomyocyten of op geïsoleerde endotheelcellen. Onder de daarvoor bedoelde sectie "8 exp." is namelijk sprake van het complete hart, terwijl onder zowel 5 als 7, afwisselend melding wordt gemaakt van cardiomyocyten dan wel endotheelcellen. Aangezien dit ongetwijfeld gevolgen zal hebben voor de berekende groeps grootte op basis van e-NOS coupling eist de DEC dat dit helder en zorgvuldig wordt vermeld.

Antwoord 4: We hebben punt 8 verduidelijkt als volgt: after the hearts are taken out, isolated myocytes the will be collected for cellular and molecular analysis. We have edited also point 5 and 7.

Vraag 5: De beantwoording vraag 3 is akkoord, maar niet aangepast in het protocol, dit dient alsnog te geschieden.

Antwoord 5: Dit is toegevoegd bij punt 7c.

Vraag 6: vraag 4 is eveneens niet aangepast in het protocol.

Antwoord 6: Dit is toegevoegd bij punt 5.

Vraag 7: Vraag 5- punt 7b is ook niet aangepast.

Antwoord 7: Dit is toegevoegd aan punt 7b

Bijkomend: wij hebben de einddatum verruimd van okt -> dec 2012

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
25-10-2011

Project: *Effect of eNOS transcription enhancing on myocyte dependent ROS.*

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: 2011-085

Diersoort: muis

Aantal dieren: 108

Einddatum: 21-10-2015

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

U