

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-086

Herziene versie

Ontvangen: 05-07-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
15-07-2011	Nieuw	IG 10-023	
Hoofdproject	CARIM		
Deelproject	2.		

Financieel beheerder		Budgetnummer	30983307 N
----------------------	--	--------------	------------

Titel van het onderzoek:

Does NOX4 play a dualistic role in pressure overload induced cardiac dysfunction in mice?

startdatum 1-9-2011

einddatum 9 1-9-2015

Duur van de proef¹⁰: max 56 dagen

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

Diergroep	1	2	3	4	5	6	
ctrl/exp/sham	Exp set 1	SHAM set 1	Exp set 2	SHAM set 2	Exp set 3	SHAM set 3	
Diersoort	muizen	muizen	muizen	muizen	muizen	muizen	
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	
Construct / mutatie ?	NOX 4 KO + wildtypes	NOX 4 KO + wildtypes	NOX 4 KO + wildtypes	NOX 4 KO + wildtypes	NOX 4 KO + wildtypes	NOX 4 KO + wildtypes	
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01	01	
Aantal	76	32	76	32	76	32	
Geslacht	M+V	M+V	M+V	M+V	M+V	M+V	
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	4-5 maanden	4-5 maanden	4-5 maanden	4-5 maanden	4-5 maanden	4-5 maanden	
Doel van de proef *	31	31	31	31	31	31	
Belang van de proef *	1	1	1	1	1	1	
Toxicologisch onderzoek *	1	1	1	1	1	1	
Bijzondere technieken *	1	1	1	1	1	1	
Anesthesie *	4	4	4	4	4	4	
Pijnbestrijding *	4	4	4	4	4	4	
Mate ongerief *	5	3	5	3	5	3	
Toestand dier einde exp*	1	1	1	1	1	1	

* VHL-coderingen zie bijlage

Does NOX4 play a dualistic role in pressure overload induced cardiac dysfunction in mice?

1. Doel van de proef.

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in cardiovascular diseases. NADPH oxidases (NOX) are an important source of ROS formation and also act as triggers for extensive ROS formation by other enzymes. Various NOX isoforms exist but their pathophysiological roles in cardiovascular diseases are unknown. Recently, [1] showed that deletion of the NOX4 gene as well as pharmacological NOX4 inhibition in mice greatly reduced ischemia-reperfusion damage of brain tissue upon stroke. This indicates that NOX4 inhibition may have substantial therapeutic merit in stroke.

What is unknown however is whether NOX4 may be involved in pathological processes in the heart, e.g. the detrimental structural and functional changes that occur in the heart if it is subjected to due to pressure overload. Recent studies [1,2] showed conflicting results regarding the effect of deleting the NOX4 gene in this respect (as will be explained in more detail in section 5).

The aim of our studies is to find out if and how NOX4 modulates the extent of damage and function impairment of the heart if the heart is subjected to mild or severe pressure overload. Since pressure overload of the heart (if not treated) is known to result in heart failure, our studies may help to define mechanisms that might diminish or aggravate heart function impairment. This knowledge is important, given the fact that heart failure poses a huge burden on health and health care. In addition, currently, NOX inhibitors are being developed as potential drugs. **We do have evidence that NOX abolition results in subtle sex dependent differences in metabolic processes. This may result in gender differences in the effect of NOX modulation on cardiac damage. It is important to study whether gender determines the outcome of NOX4 inhibition, should NOX inhibitors indeed be considered as (future) pharmacotherapeutic agents.** Therefore, our studies will help to identify (disease) conditions in which NOX inhibition would be desirable or should be avoided.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Pressure overload causes heart failure. Chronic heart failure is a major cause of death, hospitalizations and an impaired quality of life. Therefore, it is essential to identify the molecular mechanisms that lead to a deterioration, protection or improvement of the architecture and function of the heart in case of pressure overload. Identifying the role of NOX4 is particularly important, with NOX inhibitors currently being developed as potential drugs. Thus, the here proposed studies will indirectly help to elucidate the therapeutic potential and/or limitations of these agents.

3. Alternatieven

We aim to establish the pathophysiological role of NOX4 in pressure overload induced damage to the heart. Given the complex interplay between organs and regulatory (e.g. hormonal) systems in determining the cardiac response to pressure overload, there are unfortunately no alternatives to animal experiments.

4. Ethische afweging

The experiments will help to find potential new mechanisms that contribute to deteriorating or improving heart function upon pressure overload. On the one hand these experiments will help to identify therapeutic strategies to prevent or tackle chronic heart failure and therefore improve the life expectancy and quality of life in man. On the other hand, the experiments will inevitably lead to discomfort in animals. However, this discomfort will be kept to a minimum by working according to the carefully constructed and already (by the DEC) thoroughly screened and approved SOPs. In addition, the number of animals that will be used for the experiments is the minimum number that is required to generate solid (hence useful) findings. Therefore we think the use of animals in these experiments is justified.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Recently, two studies in PNAS reported conflicting and in fact opposite results regarding NOX4 in mice subjected to cardiac pressure overload. Kuroda et al [1] showed that cardiomyocyte specific NOX4 knockout mice showed less cardiac hypertrophy, a better heart function and less cardiac fibrosis than wildtype mice when subjected to cardiac pressure overload, whereas mice with cardiac specific NOX4 overexpression showed more hypertrophy and fibrosis and a worse heart function than control mice. Overall, this would indicate a detrimental role of NOX4 (or a protective role of NOX4 deletion) upon pressure overload of the heart. In contrast, Zhang et al [2] showed that generalized NOX4 KO mice had more cardiac hypertrophy and more fibrosis, whereas cardiomyocyte specific NOX4 overexpression led to less hypertrophy, a better heart function and less fibrosis than wildtype mice, if the mice were subjected to cardiac pressure overload. This would indicate a beneficial/protective role of NOX4 upon cardiac pressure overload, i.e. the exact opposite of what Kuroda et al. showed.

Apart from applying or not generalized or tissue specific NOX4 KO or NOX4 overexpression models, both studies differ in one important aspect. In Kuroda's study, the extent of pressure overload (induced by transthoracic aorta constriction) appeared to be large (high pressure gradient over the constriction in both wildtype and NOX4 KO mice and clear left ventricular hypertrophy, fibrosis and decreased ejection fraction in wildtype mice). In contrast, in Zhang's study, the extent of cardiac pressure overload (by abdominal aorta banding) was milder (less pronounced cardiac hypertrophy, fibrosis and ejection fraction decrease in wildtype mice). **Therefore, we hypothesize that NOX4 plays a dualistic role and that NOX4 deletion protects the heart against mild pressure overload but is detrimental in case of severe pressure overload. We opt for using generalized NOX4 KO mice because these mice (but not the cardiomyocyte specific KO mice) are at our disposal. In addition, generalized pharmacological NOX4 inhibition - from a drug-developmental point of view- is far easier to achieve than tissue specific NOX4 inhibition, thus making the generalized model attractive for first line testing of the feasibility or non-feasibility of the pharmacotherapeutic concept to inhibit NOX4 in case of cardiac pressure overload.** To test our hypothesis we propose experiments in (generalized) NOX4 KO versus wildtype mice that are subjected to severe and mild cardiac pressure overload by transthoracic aorta constriction (TAC). The extent of pressure overload will be carefully monitored by determining the pressure gradient over the constriction (right carotid artery versus femoral artery pressure measurements at the end of the experiment; this will allow post-hoc assignment of the animals to having received severe or mild TAC. Since above described studies differ in the duration of pressure overload (Zhang's study: 4 weeks, Kuroda's study: 6 weeks) while slowly occurring processes (e.g. angiogenesis) seem to be involved in the outcome [2], we will include various pressure overload durations. Also, the pressure overload induced burden of the heart will obviously be a function of the severity of the overload and its duration. We have chosen for a set of exponential durations of two, four and eight weeks for the following reasons: Following 2 weeks of constriction, cardiac hypertrophy is getting evident, while slower processes like cardiac fibrosis or tissue damage are generally not yet really established, thus this will allow to study the effect of NOX4 deletion in the early remodeling stage, before real damage is evident. After 4 weeks however, also slower processes will become evident, while after 8 weeks the longer-term consequences of the induced cardiac remodeling (as a result of the interplay of progressing detrimental processes and potential compensatory processes) can be studied. Using this range of time points, we will be able to answer the question whether the duration of the pressure overload determines whether the outcome of NOX4 deletion is beneficial or not.

6. Wetenschappelijke beoordeling

This specific project has been approved by :

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Homozygous NOX 4 knockout mice (bred at Maastricht University, GGO approved: IG 10-023) will be used along with wildtype mice (C57Bl6 mice).

7b. Sexe

Since chronic heart failure occurs in both male and female humans, while we aim to study mechanisms that play a role in determining the outcome of an important cause of heart failure (pressure overload) with the idea to optimize or develop therapies in the future, it is essential that both male and female animals will be used. We do have evidence that NOX abolition results in subtle sex dependent differences in metabolic processes. Therefore, it is not unlikely that sex differences in the effect on cardiac damage may be observed. Thus, we will need to screen for sex differences, although this implies that the amount of animals needs to be doubled.

7c. Aantallen

Using a power analysis according to the formula $n = 2 \times s^2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / D^2$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlijn, Springer Verlag), and a minimal statistically assessable treatment effect (D) of 1.5 standard deviations (s), this implies that for any given parameter that we will assess (e.g. left ventricular ejection fraction, -fibrosis, -contractility or NOX4 protein levels) the minimum number of animals is $n = 7$ animals per group at a power of 80 %. Four to five months old mice will either be subjected to SHAM surgery (TAC surgery but without actually pulling the ligature), mild TAC (canula thus constriction diameter 0.42 mm) or severe TAC (canula thus constriction diameter 0.37 mm). In the mild TAC group an animal loss of 20 % is expected which implies that a total animal number of $7/0.8 = 9$ will be needed for the mild TAC group. For the severe TAC, animal drop out is expected to be 30%. Thus, $7/0.7 = 10$ animals will be needed for this group. Finally for the SHAM animals (at 10% drop out) $7/0.9 = 8$ mice per group will be needed for the SHAM animals. Note that the mentioned animal drop out numbers are based on our experience and are kept to an absolute minimum by using an as minimal invasive as possible TAC surgical procedure (see SOP) and well trained Artikel12 staff with ample experience in this as well as a whole range of other surgical procedures.

Thus the number of animals per experiment (TAC duration) is:

Experiment set 1 (2 weeks TAC):

$(8 \text{ SHAM} + 9 \text{ mild TAC} + 10 \text{ severe TAC}) \times 2 \text{ (male/female mice)} \times 2 \text{ (NOX4 KO versus wildtype mice)} = 32 \text{ SHAM} + 36 \text{ mild TAC} + 40 \text{ severe TAC mice} = 108 \text{ mice.}$

Experiment set 2 (4 weeks TAC):

$(8 \text{ SHAM} + 9 \text{ mild TAC} + 10 \text{ severe TAC}) \times 2 \text{ (male/female mice)} \times 2 \text{ (NOX4 KO versus wildtype mice)} = 32 \text{ SHAM} + 36 \text{ mild TAC} + 40 \text{ severe TAC mice} = 108 \text{ mice.}$

Experiment set 3 (8 weeks TAC):

$(8 \text{ SHAM} + 9 \text{ mild TAC} + 10 \text{ severe TAC}) \times 2 \text{ (male/female mice)} \times 2 \text{ (NOX4 KO versus wildtype mice)} = 32 \text{ SHAM} + 36 \text{ mild TAC} + 40 \text{ severe TAC mice} = 108 \text{ mice.}$

Total number: $96 \text{ SHAM mice} + 108 \text{ mild TAC} + 120 \text{ severe TAC mice} = 324 \text{ mice.}$

Also see section 8 and the flowcharts that are added to this protocol as a powerpoint file to understand the various comparisons that are to be made.

Since in the studies of Zang and Kuroda, male mice were used, we will initially conduct the studies in male mice only. In case clear differences between NOX4 KO and wildtype mice are observed, we will continue to perform the same experiments in female mice; otherwise no further (female) animals will be used.

8. Experiment

ALSO see the flowcharts that are added to this DEC-application as a powerpoint file.

In all experiments: At the beginning of the experiment NOX4 knockout and wild type C57/Bl6 mice will be subjected to mild transthoracic aorta constriction (TAC at canula diameter of 0.42 mm, severe TAC (canula diameter 0.37 mm) or sham surgery according to [1] and echocardiography (including aorta blood flow measurements before, at and after the constriction site) according to [2] under isoflurane anesthesia.

In experiment set 1:

Two weeks after the TAC surgery, animals will undergo echocardiography ([3]) and installment of a left femoral artery catheter ([4]) followed by terminal hemodynamic measurements ([5]) under isoflurane anesthesia. These procedures allow measurement of heart function and of the pressure gradient over the aorta constriction (by determining the right carotid artery and left femoral artery blood pressures). After these measurements, the anesthetized mice will be sacrificed by blood withdrawal and their organs will be collected.

In experiment set 2:

The mice will undergo the same procedure as in set 1, but 4 weeks after TAC surgery.

In experiment set 3:

The mice will undergo the same procedure as in set 1, but 8 weeks after TAC surgery.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

To reduce the number of times that the mice are to be anesthetized, procedures will be carried out sequentially. In all experiments, 1x isoflurane anesthesia will be applied i.e. for TAC surgery ([6]), and echocardiography ([7]) on the first day of the experiment and 1x isoflurane anesthesia for echocardiography ([8]), femoral artery catheter installment ([9]) and terminal hemodynamic measurements ([10]) on the last day of the experiment.

Thus in total all mice will be anesthetized twice with isoflurane.

9b. Pijnbestrijding

On the first day of the experiment analgesia will be performed according to the approved SOP (TAC surgery), i.e. buprenorphine will be applied. The choice for this agent (apart from being an effective analgesic) instead of NSAIDs is made because NSAIDs suppress inflammation, a process that is intertwined with oxidative stress and hence may influence not only the outcome of the pressure overload, but also the effect of interfering with NOX4 as a reactive oxygen species generating moiety. Buprenorphine will be applied s.c. at a dose of 0.05 mg/kg once before surgery, once 8-12 hours later and once another 8-12 hours later.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Animals will be inspected on a daily basis and monitored for signs of illness and discomfort. If signs of serious discomfort (e.g. > 15 % weight loss, lethargy but also signs of advanced heart failure like shortness of breath/difficulties with breathing, edema or cyanosis) occur, the animals will be sacrificed by applying a pentobarbitone overdose (200 mg/kg i.p.). Should other signs of discomfort or signs of inflammation and disease be observed, the Artikel 14 functionaris will be consulted.

10a. Ongerief



Tables with the interventions, discomfort scores, estimated duration and frequency of the intervention along with cumulative data are given below. It should be said that due to the TAC procedure, the animals may develop mild heart failure. However, symptoms thereof are generally not visible. This is also often the case in humans with early stage heart failure (except when exerting exercise). Indeed, animals that have underwent TAC in our experience look and act vivid and show normal behavior. Nevertheless, in the TAC operated animals dropout may occur due to sudden death (cardiac arrest). It is hard to quantitate in how far the animals overall will experience discomfort from having had the TAC surgery (apart from the surgery and the recovery thereof) as they generally do not show obvious signs of discomfort, but may suddenly die. Nevertheless, the fact that there might be potential discomfort has been implicated in the discomfort score of 5 (serious), that is attributed to the TAC surgery (indicated with * in the table) as well as the cumulative discomfort score of 5. If however obvious signs of discomfort or symptoms of serious heart failure should occur, we will proceed as specified in section 10b

Group	Type of intervention	Discomfort score	Approx. duration (min)	Frequency
All TAC animals	echocardiography	2	10-15	2
	TAC surgery	5*	20-40	1
	Femoral artery catheter	3	10-20	1
	Terminal hemodynamics	2	20-40	1
Cumulative (sum)		5*	60-115 min intervention time	5 interventions
		* including post-surgery consequences of TAC		

Group	Type of intervention	Discomfort score	Approx. duration (min)	Frequency
SHAM animals	echocardiography	2	10-15	2
	SHAM-TAC surgery	3	20-40	1
	Femoral artery catheter	3	10-20	1
	Terminal hemodynamics	2	20-40	1
Cumulative (sum)		3	60-115 min intervention time	5 interventions

10b. Welzijnsevaluatie

As said, the mice will be regularly inspected for signs of illness or discomfort. Should this occur, buprenorphine will be applied and the animal closely monitored in the recovery room of ... Signs of (serious) heart failure such as edema, shortness of breath and decreases of body weight might be expected in some cases. In case the animal's condition is deteriorating or (serious) discomfort is becoming obvious, the animal will be sacrificed as specified under 9. Should other signs of illness, discomfort or disease occur, the Artikel 14 functionaris will be contacted.

11. Verzorging en huisvesting

Surgery and 1 day of recovery (in a special heated room) of the animals will take place in the animal lab ... Thereafter animals will be housed at the CPV under standard conditions. In case of questions or problems (e.g. the observation by the CPV that an animal's condition is getting worse), an artikel 12 functionaris ... may be contacted or ... as the responsible artikel 9 researcher.

12. Deskundigheid

All animal handling procedures will be conducted by experienced artikel 12 personnel or by artikel 9 personnel (under supervision of artikel 12 personnel). The involved artikel 12 personnel have previously conducted similar experiments on numerous occasions.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

For the procedures/animal handlings (including anesthesia and analgesia), we would like to refer to the approved SOPs on the CPV website, i.e. ... (femoral artery catheter installment), ... (echocardiography), ... (terminal hemodynamics; dP/dt) and ... (TAC surgery).

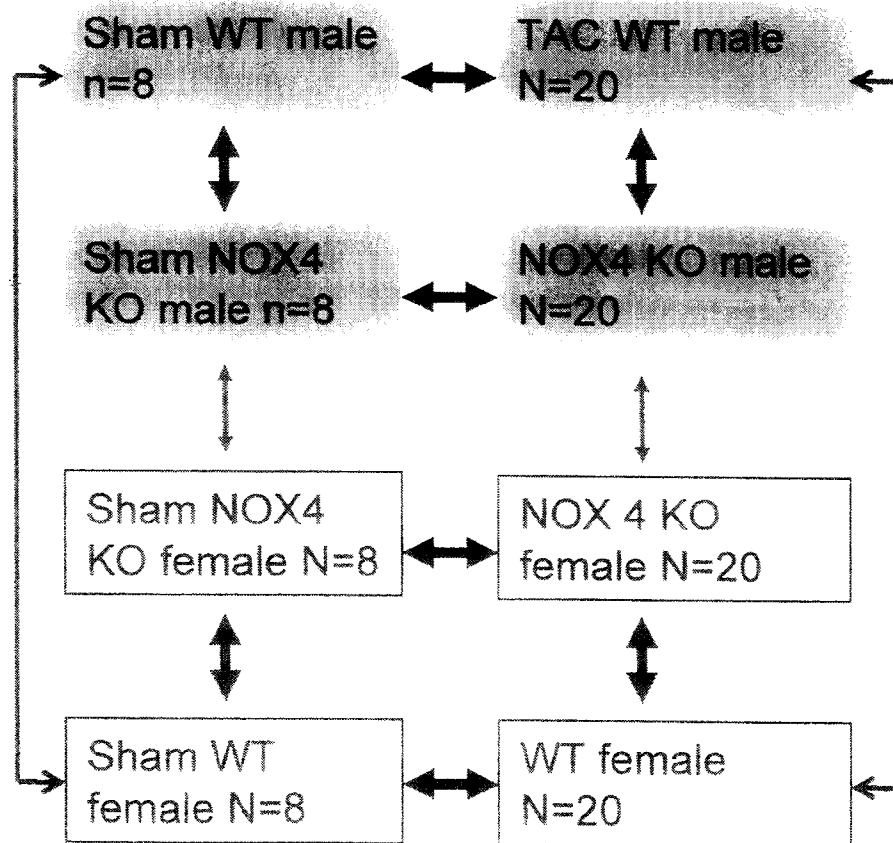
Relevante literatuur

1) Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 107(35):15565-15570.

2) Zhang M, Brewer AC, Schroder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 107(42):18121-18126.

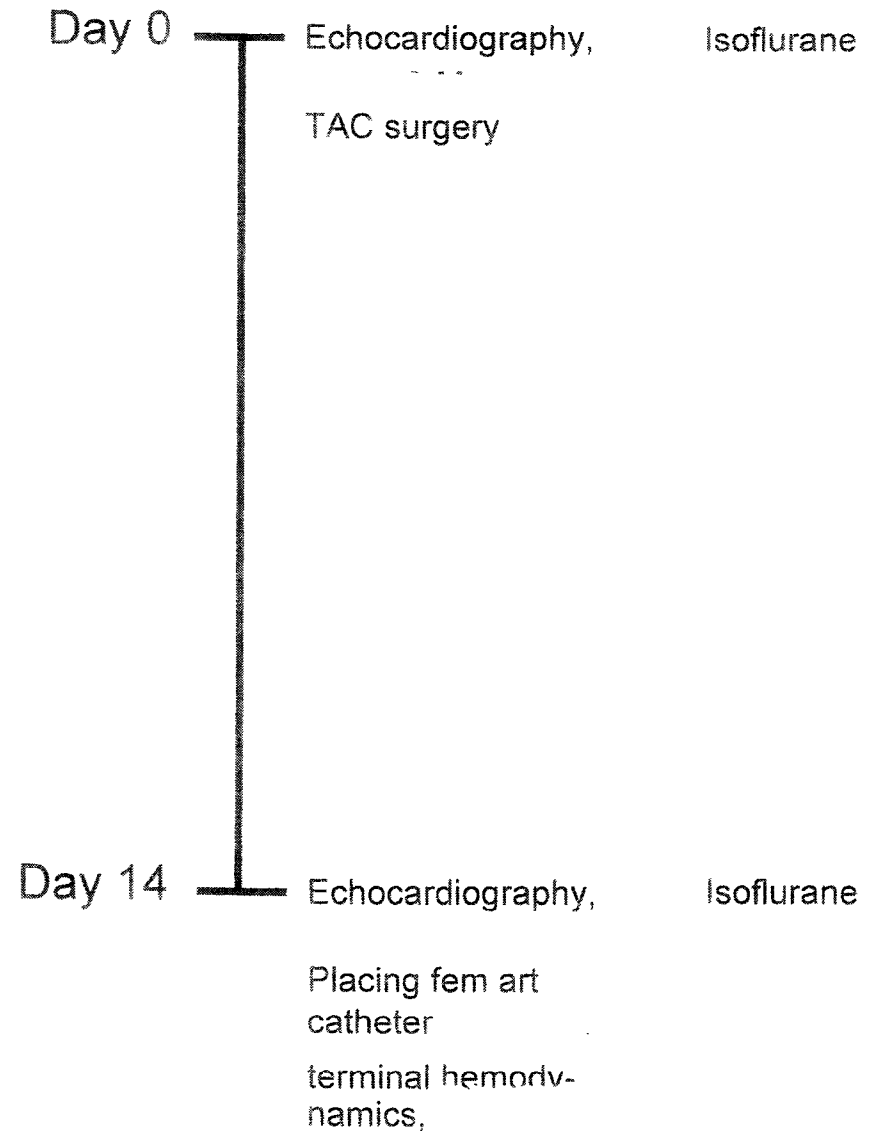
EXPERIMENT SET 1: Follow up for 2 weeks

Groups and numbers



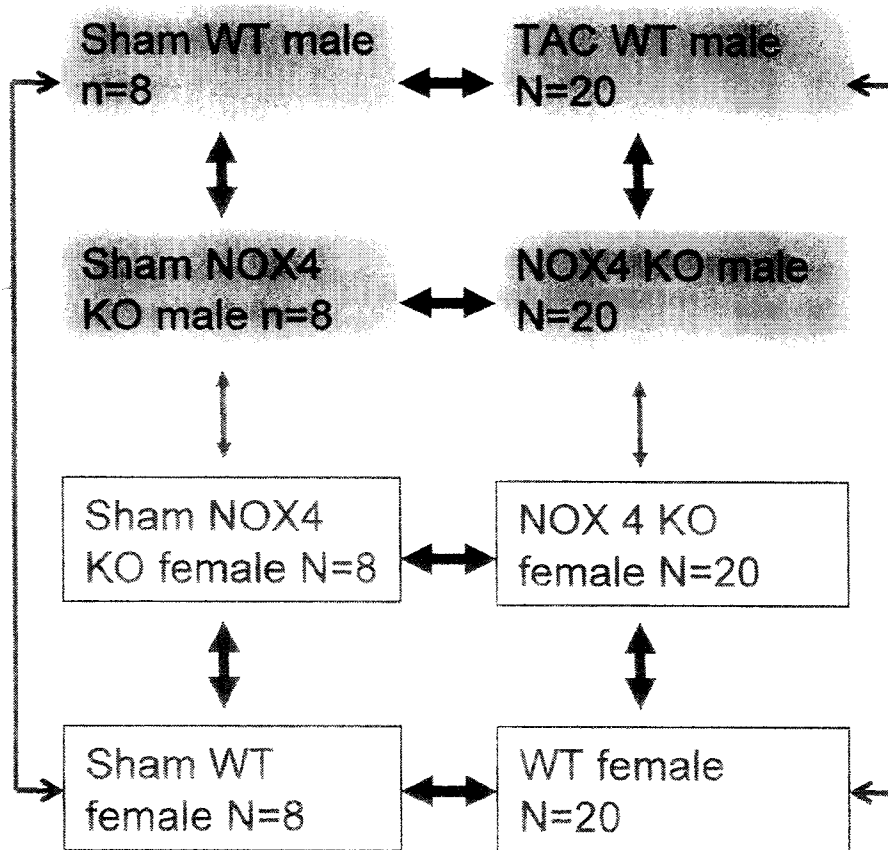
Total number: 112 animals

Time procedure/SOP, anesthesia



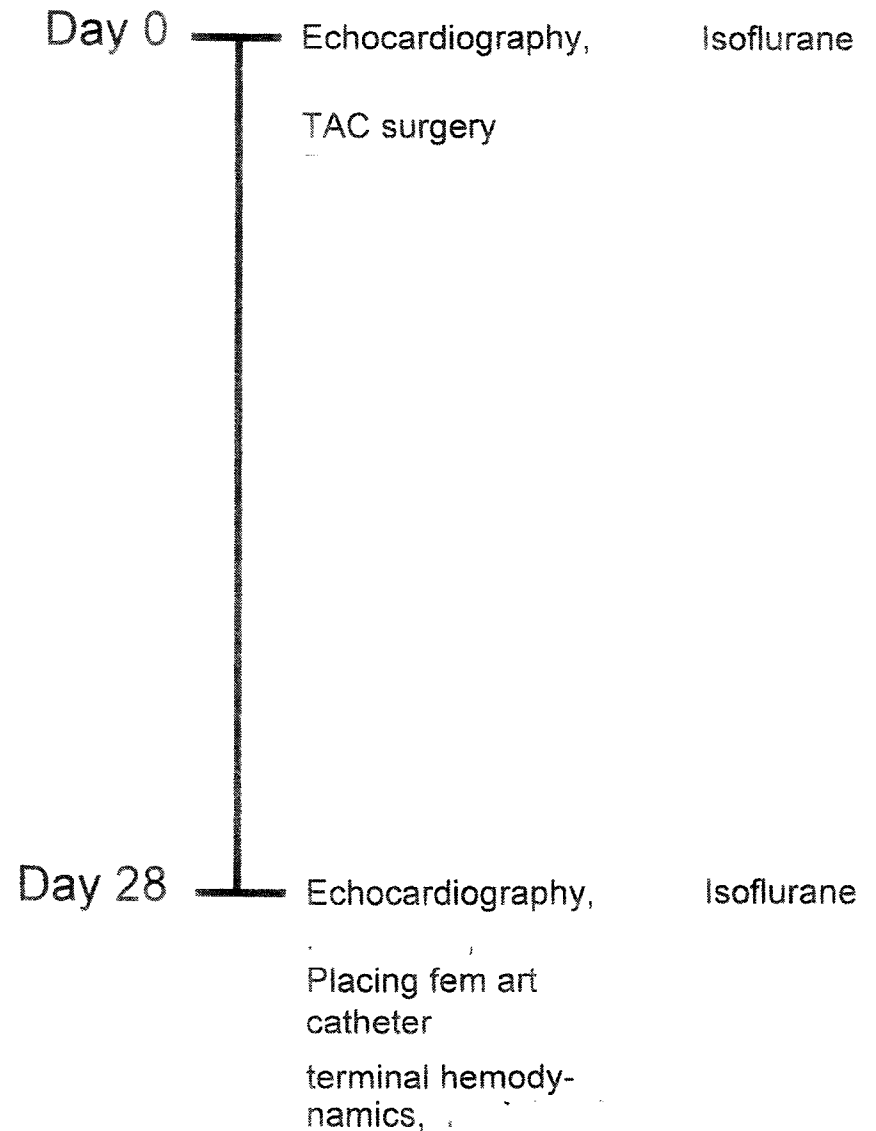
EXPERIMENT SET 2: Follow up for 4 weeks

Groups and numbers



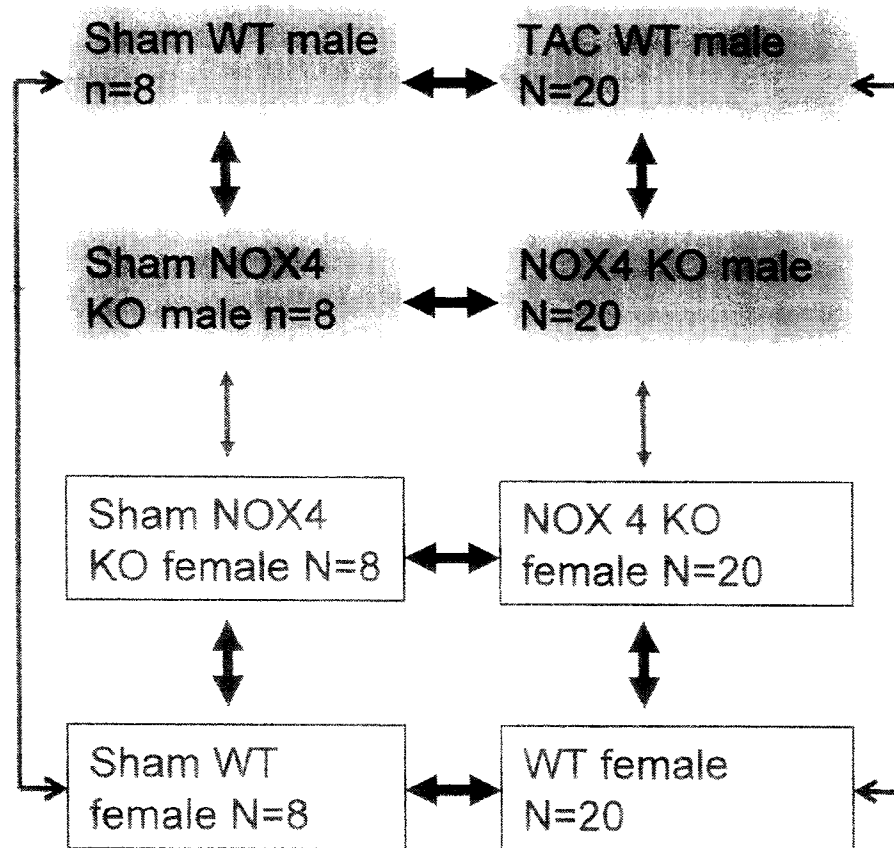
Total number: 112 animals

Time procedure/SOP, anesthesia



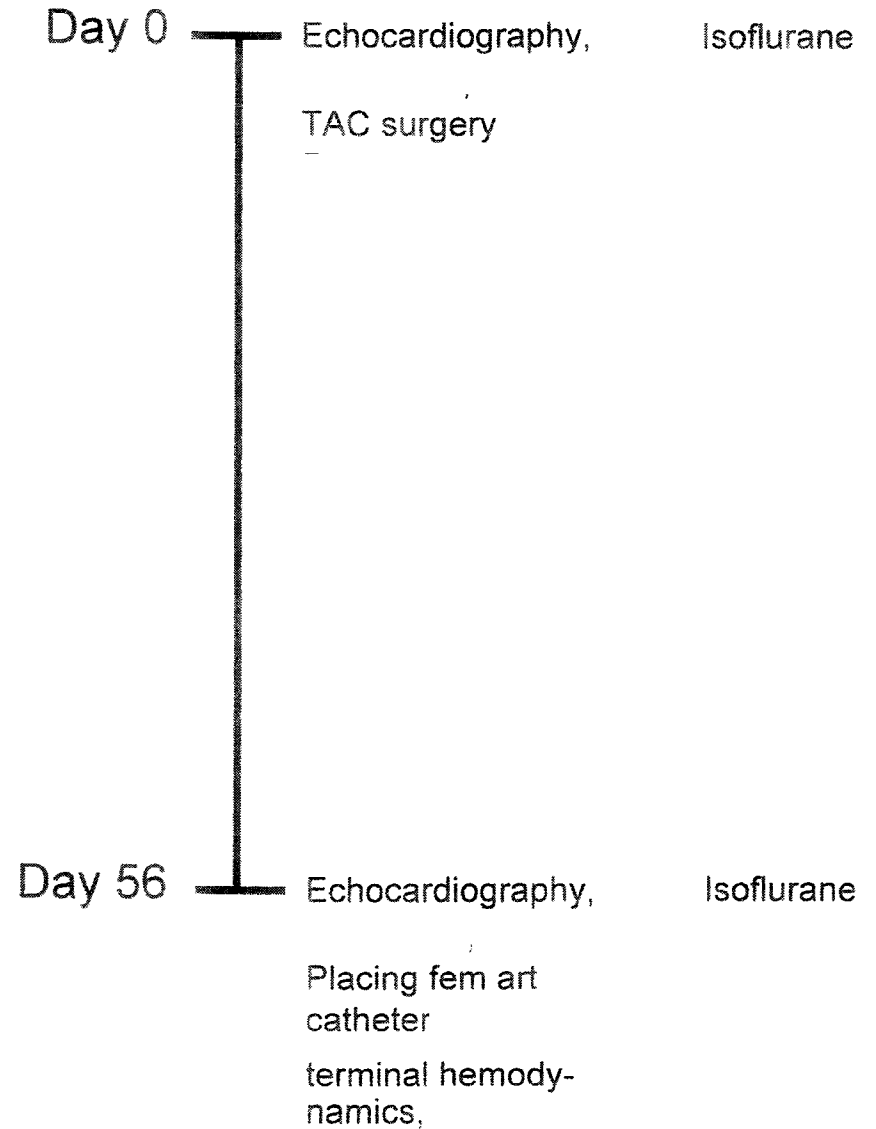
EXPERIMENT SET 3: Follow up for 8 weeks

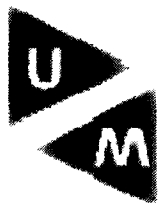
Groups and numbers



Total number: 112 animals

Time procedure/SOP, anesthesia





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, 29-06-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *"Does NOX4 play a dualistic role in pressure overload induced cardiac dysfunction in mice?"*, is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de shamgroepen apart op het voorblad te vermelden, omdat deze minder ongerief hebben (code 03).
- De DEC verzoekt bij punt 1 in de vraagstelling, te motiveren waarom mannen en vrouwen worden gebruikt.
- De DEC vraagt zich af of met de gekozen experimentele opzet, en in het bijzonder de keuze van whole-body KO-muis, de vraagstelling aangaande het dualistische karakter van NOX4 kan worden beantwoord.

Deze vraagstelling komt voort uit 2 studies waarbij tegengestelde resultaten werden gevonden aangaande de rol van NOX4 in hartpathologie. Deze kunnen volgens de onderzoeker mogelijk verklaard worden door een verschil in de mate van "pressure overload" als variabele tussen de twee studies.

De DEC merkt op dat deze redenering stand houdt als verklaring voor de tegengestelde bevindingen voortvloeiend uit de experimenten waarin NOX4 hart-specifiek tot over-expressie werd gebracht. Echter, om de gevolgen van NOX4 afwezigheid op de hartpathologie te testen, werden 2 verschillende strategieën gebruikt in de 2 studies: whole-body versus weefsel-specifieke knock-out. Dit brengt een 2^e variabele met zich mee (naast het verschil in de mate van "pressure overload") die mogelijk de verklaring is van de schijnbaar tegengestelde bevindingen (een rol van NOX4 in andere cellen dan de cardiomyocyt die bijdraagt aan het fenotype). Om dus te toetsen of de verschillende bevindingen tussen de 2 studies inderdaad het gevolg zijn van het verschil in de mate van "pressure overload", vraagt de DEC zich af waarom er niet is gekozen om deze proef uit te voeren in de NOX4 hart-specifieke over-expresserende dieren, teneinde op basis van slechts 1 en geen 2 variabelen tot een sluitend experiment te komen dat de schijnbaar tegengestelde bevindingen uit de 2 studies in overeenstemming zou kunnen brengen.

- Bij punt 7c stelt de DEC voor, bij dit experiment, de sexe te gebruiken zoals in de 2 voorgaande studies en daarna een eventuele invloed van het verschil in de geslachten te bestuderen.
- DEC stelt voor om met experiment 3 te starten en alleen op basis van de uitkomsten, vervolgens experiment 1 en 2 uit te voeren.
- Bij punt 9c verzoekt de DEC "regularly inspected" te specificeren.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven (ook dient vermeld te worden het leven met TAC).

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 2011-086, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoord van de onderzoekers aan de vragen en opmerkingen van de DEC naar aanleiding van DEC protocol 2011-086, besproken op de vergadering van 24 juni 2011.

Allereerst willen de onderzoekers de DEC bedanken voor de grondige wijze waarop ze het betreffende voorstel hebben doorgenomen en behandeld.

Hieronder volgen de door de DEC gestelde vragen en/of de gemaakte opmerkingen en onze respons daarop. In het DEC protocol zelf zijn de nodige aanpassingen gemaakt (zoals ook in ons antwoord omschreven) die voor de duidelijkheid in het aangepaste DEC-protocol grijs gemarkeerd zijn.

- De DEC verzoekt de shamgroepen apart op het voorblad te vermelden, omdat deze minder ongerief hebben (code 03).

Respons:

Het voorblad is corresponderend aangepast, dwz sham dieren werden apart vermeld, de aantallen aangepast, alsmede de ongeriefscore bij de SHAM dieren op 3 gezet. Aangezien er voor de experimentele groepen slechts 7 kolommen beschikbaar zijn, hebben we hierbij wel voor de optie gekozen knockout en wildtype muizen per kolom bij elkaar te nemen.

- De DEC verzoekt bij punt 1 in de vraagstelling, te motiveren waarom mannen en vrouwen worden gebruikt.

Respons:

Hoewel we reeds bij punt 7b hadden aangegeven waarom zowel mannelijke als vrouwelijke muizen moeten worden gebruikt in onze experimenten, hebben we onder punt 1 een extra alinea toegevoegd (de laatste alinea van sectie 1) waarin deze keuze wat uitgebreider wordt beargumenteerd:

"We do have evidence that NOX abolition results in subtle sex dependent differences in metabolic processes. This may result in gender differences in the effect of NOX modulation on cardiac damage. It is important to study whether gender determines the outcome of NOX4 inhibition, should NOX inhibitors indeed be considered as (future) pharmacotherapeutic agents."

- De DEC vraagt zich af of met de gekozen experimentele opzet, en in het bijzonder de keuze van whole-body KO-muis, de vraagstelling aangaande het dualistische karakter van NOX4 kan worden beantwoord. Deze vraagstelling komt voort uit 2 studies waarbij tegengestelde resultaten werden gevonden aangaande de rol van NOX4 in hartpathologie. Deze kunnen volgens de onderzoeker mogelijk verklaard worden door een verschil in de mate van "pressure overload" als variabele tussen de twee studies. De DEC merkt op dat deze redenering stand houdt als verklaring voor de tegengestelde bevindingen voortvloeiend uit de experimenten waarin NOX4 hart-specifiek tot over-expressie werd gebracht. Echter, om de

gevolgen van NOX4 afwezigheid op de hartpathologie te testen, werden 2 verschillende strategieën gebruikt in de 2 studies: whole-body versus weefsel-specifieke knock-out. Dit brengt een 2^e variabele met zich mee (naast het verschil in de mate van "pressure overload") die mogelijk de verklaring is van de schijnbaar tegengestelde bevindingen (een rol van NOX4 in andere cellen dan de cardiomyocyt die bijdraagt aan het fenotype). Om dus te toetsen of de verschillende bevindingen tussen de 2 studies inderdaad het gevolg zijn van het verschil in de mate van "pressure overload", vraagt de DEC zich af waarom er niet is gekozen om deze proef uit te voeren in de NOX4 hart-specifieke over-expresserende dieren, teneinde op basis van slechts 1 en geen 2 variabelen tot een sluitend experiment te komen dat de schijnbaar tegengestelde bevindingen uit de 2 studies in overeenstemming zou kunnen brengen.

Respons:

Over dit door de DEC terecht aangedragen punt hebben de onderzoekers uiteraard vóór het schrijven van de DEC-aanvraag nagedacht (we wijzen hier dan ook al op in onze wetenschappelijke onderbouwing in punt 5).

Inderdaad kan het niet worden uitgesloten dat een mogelijke reden voor de tegengestelde resultaten van beide studies ligt in het feit dat in 1 studie een cardiomyocyt specifieke NOX4 KO muis gebruikt werd en in een andere studie een algemene NOX4 KO muis. Daar staat echter tegenover dat in beide studies ook een cardiaal NOX4 overexpressie model gebruikt werd wat tegengestelde effecten op hartfunctie en -structuur laat zien als de KO modellen. Dus ook in dit opzicht staan beide studies haaks op elkaar en lijkt het verschil tussen beide studies niet door een lokaal versus gegeneraliseerd NOX4 gerelateerd fenomeen verklaard te kunnen worden.

Echter, afgezien daarvan zijn er een tweetal belangrijke redenen waarom we voor een gegeneraliseerde NOX4 KO kiezen en deze redenen hebben we ook onder punt 5 kort erbij vermeld in onze aangepaste DEC-aanvraag. De eerste reden is een pragmatische reden: hoewel we hartspecifieke NOX4 KO muizen willen genereren, hebben we deze dieren op dit moment (of op korte termijn) niet ter beschikking. Een tweede reden is dat een belangrijke drijfveer om deze experimenten te doen (zoals aangegeven onder punt 1) het feit is dat NOX remmers worden ontwikkeld als potentiële geneesmiddelen. Hoewel drug targeting naar het hart theoretisch mogelijk is, zal dit een grote technische en extra barrière vormen voor de toepasbaarheid van NOX inhibitoren. Als NOX inhibitoren kans van slagen willen hebben als geneesmiddel, moeten ze bij voorkeur als pilletje ingenomen kunnen worden, maar daarmee zullen ze een algehele en niet hartspecifieke NOX4 inhibitie bewerkstelligen (tenzij ze op uiterst slimme wijze naar het hart gesluisd zouden worden, maar zoals gezegd is dit technisch en praktisch veel lastiger). Met andere woorden: een gegeneraliseerd NOX4 KO model is veel beter geschikt dan een hartspecifiek NOX4 KO model om de feasibility van het therapeutische concept van NOX4 inhibitie te testen. Feit blijft echter dat ook het nagaan van het effect van hartspecifieke NOX4 inhibitie wetenschappelijk van belang is, maar deze strategie zou eventueel in een later stadium (in een

nieuw DEC protocol en na het ontwikkelen van hartspecifieke NOX4 KO dieren) overwogen kunnen worden.

In de tekst werd onder punt 5 het volgende toegevoegd:

"We opt for using generalized NOX4 KO mice because these mice (but not the cardiomyocyte specific KO mice) are at our disposal. In addition, generalized pharmacological NOX4 inhibition - from a drug-developmental point of view- is far easier to achieve than tissue specific NOX4 inhibition, thus making the generalized model attractive for first line testing of the feasibility or non-feasibility of the pharmacotherapeutic concept to inhibit NOX4 in case of cardiac pressure overload."

- Bij punt 7c stelt de DEC voor, bij dit experiment, de sexe te gebruiken zoals in de 2 voorgaande studies en daarna een eventuele invloed van het verschil in de geslachten te bestuderen.

De onderzoekers zijn het met dit prima voorstel volledig eens, daar het mogelijk tot een reductie van het aantal te gebruiken dieren kan leiden (bij negatieve resultaten). Daarom werd de volgende tekst aan sectie 7c toegevoegd:

"Since in the studies of Zang and Kuroda, male mice were used, we will initially conduct the studies in male mice only. In case clear differences between NOX4 KO and wiltype mice are observed, we will continue to perform the same experiments in female mice; otherwise no further (female) animals will be used."

- DEC stelt voor om met experiment 3 te starten en alleen op basis van de uitkomsten, vervolgens experiment 1 en 2 uit te voeren.

Ook dit punt zou theoretisch tot een reductie van het aantal dieren kunnen leiden maar desalniettemin gaan de onderzoekers hierin niet mee. De reden hiervoor is het feit dat korte en lange termijn (mal)adaptatie processen op een tegengestelde manier door NOX inhibitie beïnvloed zouden kunnen worden. Zo bestaan er aanwijzingen dat NOX4 op lange termijn betrokken is bij angiogenese en op korte termijn bij weefselschade. Zou men alleen maar na 8 weken de hartfunctie en- structuur bepalen dan zou men meer acute door NOX4 gemoduleerde processen over het hoofd kunnen zien omdat men slechts de resultante (van korte en lange termijn samen) bestudeert. Tevens kan deze resultante al dan niet sneller of minder snel tot stand komen onder invloed van NOX4. M.a.w. NOX4 KO versnelt of vertraagt het tot stand komen van een verandering van b.v. de hartfunctie ten gevolge van TAC, terwijl de uiteindelijke hartfunctie niet noodzakelijkerwijs hoeft -maar wel kan- verschillen van die van wildtype TAC dieren. Het nagaan van deze mogelijkheden is van belang om na te gaan of in de toekomst farmacologische NOX4 inhibitie therapeutische perspectieven zou kunnen bieden.

- Bij punt 9c verzoekt de DEC "regularly inspected" te specificeren.

In het aangepaste DEC protocol werd "regularly inspected" vervangen door "inspected on a daily basis".

- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven (ook dient vermeld te worden het leven met TAC).

In sectie 10a zijn de gegevens voor de TAC en sham dieren nu in de gevraagde tabelvorm gegeven. Tevens werd er rekening gehouden met het leven met TAC. TAC kan leiden tot (mild) hartfalen, maar echte symptomen hiervan ziet men maar zelden optreden (ook bij mensen ziet men bij de vroege stadia van hartfalen geen/nauwelijks klachten en symptomen). Anderzijds ziet men sterfte optreden ten gevolge van een plotse dood (hartstilstand). Het valt moeilijk te kwantificeren in hoeverre het welbevinden van het dier onder e.e.a. te leiden heeft, maar bij de ongerief score van de TAC chirurgie (score 5; ernstig) en de cumulatieve ongerief score (5; ernstig) zijn de eventuele consequenties die TAC op het leven van het dier kan hebben verdisconteerd.

De tekst van sectie 10a van het DEC protocol is nu als volgt:

*"Tables with the interventions, discomfort scores, estimated duration and frequency of the intervention along with cumulative data are given below. It should be said that due to the TAC procedure, the animals may develop mild heart failure. However, symptoms thereof are generally not visible. This is also often the case in humans with early stage heart failure (except when exerting exercise). Indeed, animals that have underwent TAC in our experience look and act vivid and show normal behavior. Nevertheless, in the TAC operated animals dropout may occur due to sudden death (cardiac arrest). It is hard to quantitate in how far the animals overall will experience discomfort from having had the TAC surgery (apart from the surgery and the recovery thereof) as they generally do not show obvious signs of discomfort, but may suddenly die. Nevertheless, the fact that there might be potential discomfort has been implicated in the discomfort score of 5 (serious), that is attributed to the TAC surgery (indicated with * in the table) as well as the cumulative discomfort score of 5. If however obvious signs of discomfort or symptoms of serious heart failure should occur, we will proceed as specified in section 10b."*

Tenslotte is tevens ook de tekst van sectie 10b l op basis hiervan licht aangepast, zoals in het aangepaste DEC protocol te zien is m.b.v. de grijze markeringen.



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
18-07-2011

Project: Does NOX4 play a dualistic role in pressure overload induced cardiac dysfunction in mice?

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

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

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

Projectnummer: 2011-086
Diersoort: muis
Aantal dieren: 324
Einddatum: 15-07-2015

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.

Dr. R. Hoenderken
Voorzitter DEC-UM

Dr. S. Heeneman
Vicevoorzitter DEC-UM

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM
T
para secretariat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM
T (043)

Bezoekadres

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht