

NADPH oxidases in angiogenesis: the effects of NOX1, NOX2 and NOX4 in a model of chronic peripheral ischemia.

1. Doel van de proef.

Chronic ischemia, such as in peripheral artery disease, is caused by a permanent (sub)total occlusion of a major artery. Just as in acute ischemia, reperfusion is necessary for tissue survival, but can also be detrimental in terms of oxidative stress (ie the formation of reactive oxygen species). Angiogenesis (the formation of new blood vessels) is a crucial part of the physiological restoration of blood flow.

NADPH oxidases are enzyme that have as their sole function the production of these ROS. It has already been shown that these NOXes are major contributors to the detrimental ROS produced in the acute phases of ischemia, but they are also involved in physiologic processes such as angiogenesis and proliferation and differentiation of cells.

By using a mouse model of hindlimb ischemia in NOX4 KO, NOX1KO and NOX2KO mice, we want to investigate the roles of these different isoforms on the damage caused by ischemia as well as their possible protective roles in the angiogenesis and remodeling response during chronic ischemia. We also want to investigate a possible gender-differences in the role of the NOX isoforms in these processes. Ligation of the femoral artery causes complete interruption of the blood flow to the hindlimb, by following the mice in time, it is possible to study the chronic effects of the ischemia and the formation of new blood vessels. This hindlimb ischemia model is the best available model to study peripheral artery disease.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Peripheral artery disease is one of the manifestations of ischemia-reperfusion injury in man, next to stroke and myocardial infarction. Treatment options for peripheral artery disease are disappointing and many patients suffer from decreased mobility or other disabling problems due to the chronic ischemia in their legs.

Understanding the mechanisms of damage due to chronic ischemia and the processes of angiogenesis and remodeling that are needed for optimization of the blood flow is thus needed to optimize treatment and preventive measures to enhance the quality of life for people suffering from peripheral artery disease.

3. Alternatieven

Since there is a complex interplay within an organism between organs, and regulating systems (e.g.hormones and cytokines), it is not possible to study these effects in vitro. Animal experiments are the only option to study this complex disease. Since we aim to test the feasibility of a new approach that in future can be translated into a clinically applicable concept, pre-clinical experiments are desirable.

4. Ethische afweging

While the experiments on the one hand will help to find potential new therapeutic strategies to tackle the morbidity of peripheral artery disease and thus improve the life expectancy and quality of life in man, they on the other hand will inevitably lead to discomfort in animals. In our view we consider that the serious discomfort of the animals is outweighed by the scientific importance.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

In the case of ischemia, both in the acute or in a chronic way, reperfusion is necessary for survival of the tissue, but it is also detrimental, causing oxidative stress (ie the formation of reactive oxygen species (ROS)). The cause of chronic ischemia is mostly a partial occlusion of a vessel, with a resulting decreased supply of oxygen and nutrients to the organs. While in the case of acute ischemia, reperfusion can be met when the occluded vessel is opened again, with chronic ischemia the processes of angiogenesis (formation of new blood vessels) and atherogenesis (adaptation of preexisting blood vessels) are the most important mechanisms to reestablish the blood flow. Both ischemia and the ROS formed during (partial) reperfusion are triggers that regulate these 2 important processes. Thus, although ROS can be detrimental in the acute phase of ischemia-reperfusion injury, they can also be protective in the more chronic ischemic state, favoring angiogenesis and tissue remodeling.

NADPH oxidase (NOX) is a family of enzymes known to produce ROS and to be involved in a number of important pathological and physiological events [1,2]. The different types of NOX enzymes display distinct tissue distribution patterns and can be activated in a highly localized manner *e.g.* by ischemia. It is believed that once activated, NOX derived ROS initiate the local activation of a battery of other enzymes that subsequently generate ROS in bulk amounts [3]. Thus, with NOX being the initiator of a cascade resulting in excessive pathologic ROS formation, inhibiting NOX seems a promising approach to reduce tissue damage in ischemia-reperfusion in the acute phase. On the other hand, in chronic ischemic diseases NADPH oxidases might be protective at a later stage after the ischemia.

In this study we want to investigate the effects of NOX4 (the most abundantly expressed isoform within the vasculature) in a model of chronic ischemia, the ligation of the femoral artery in the mouse. Research by others has already shown that inhibiting NOX2 can result in an impaired blood flow recovery with less angiogenesis in this model [4,5], but the evidence is conflicting since there is also proof that the formation of collaterals is not declined in NOX2 KO mice [6] and in a model of increased oxidative stress, NOX2 KO resulted in a protection [7]. Very recently, a study by Craige et al was published, using injections of NOX4-adenovirus into the hindlimb before surgery, pointing indeed towards a role of NOX4 in angiogenesis [8].

We want to elucidate the role of NOX 4 in angiogenesis by using our NOX4 KO mice to create permanent ischemia of the hindlimb. Furthermore, a direct comparison between different isoforms has not been performed yet. Therefore, we want to compare the effect of the NOX4 KO with a NOX2 KO and NOX1 KO to get a more clear view of the roles of the different isoforms in angiogenesis and the outcome of induced ischemia. Moreover we also want to find possible gender-differences in the role of NOX-isoforms in these processes. Gender-differences have been shown to be present in the response to oxidative stress and ROS [9]. NOX abolition might also result in subtle sex differences in certain metabolic processes and hence might influence the response to ischemia. It has been shown that in the microcirculation of SHR rats [10] and the cerebral circulation of rats [11], gender influences the expression, activity and function of NADPH oxidase.

6. Wetenschappelijke beoordeling

This specific project has been approved by _____

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

For experiment set 1 we will use surplus mice aged 8-12 weeks.

For experiment set 2, homozygous NOX 4 knockout mice (developed at Monash University and now transferred and bred at Maastricht University, (GGO approved: IG 10-023) will be used along with wildtype mice (C57Bl6 mice). For experiment set 3 we will use NOX2 KO mice and their matched wildtypes (bred at Harlan). For experiment set 4 we will use NOX1 KO mice (developed at Monash University and transferred and now bred at CPV) together with their matched wildtype mice.

Although all knockout mice originate from the C57Bl6 strain, differences in their background exist. Therefore, we cannot simply use one group of wildtype mice for all knockout mice, but will have to use separate groups of wildtype mice that match the background of the NOX1, NOX2 and NOX4 knockout mice respectively.

The reason for using mice is the fact that genetically modified strains are available and that we would like to be able to compare the experimental results. In addition, the _____ is well equipped for conducting surgery, hemodynamic measurements, histology and other techniques using mice. At the end of the experiments all animals will be sacrificed.

7b. Sexe

We will use both male and female mice to investigate possible gender-differences. Although we don't know if gender differences will indeed exist, this does seem likely, since from literature we do know that hormones can influence the angiogenesis, while NOX abolition results in subtle sex dependent differences in metabolic processes. Thus we will use males and females in a mixed way. However, our primary comparison will be between KO and WT animals in both genders, thus comparing male KO with male WT, and female KO with female WT. Next to this we will also compare male and females of the same genotype to find sex-differences. The differences can be dependent on the genotype (differences in metabolic responses in KO), the sex (differences in angiogenesis caused by hormones) OR an interaction between the two. This means that if the WT does not show a difference between male and female, there can still be a difference between males and females in the KO's. Therefore, males and female mice are considered to be different groups, thus we will have to double the number of animals. We thus have 8 groups in every experiment set (male KO and WT/ male sham KO and WT/female KO and WT/ female sham KO and WT).

7c. Aantallen

Our primary read out will be angiogenesis by ways of Echo Doppler Flow measurements and the use of microspheres. We would like to be able to find a difference in these parameters of 25%. From the literature [4,5,7] and the experience of the department of physiology with using this technique, we expect the variance for the Doppler flow to be maximally around 15%, the variance of the use of microspheres in mouse is also around the 15-20% [11,12]. Since the method of injecting microspheres in the mouse has not been performed by our lab before, we will start with 10 pilot animals to establish the method correctly (right way of injection, bolus vs slow infusion and right amount of microspheres) and to test if the microsphere-method can indeed be used to get reliable results.

Using a power analysis according to the formula $n = 2x \frac{s^2x}{(Z\alpha/2 + Z\beta)^2/D^2}$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlijn, Springer Verlag), with an α 0,05 and a power of 80%, a minimal statistically assessable treatment effect (D) of 25% and a variance of 15% (s), this implies that at a power of 80 % the minimum number of animals is $n = 15.7 \frac{s^2}{D^2} = 15.7 * (0.36) = 6$ per group. Taking into account an animal loss of 10% (estimated from the experience of the department of physiology with the ligation of the femoral artery), this implies a total animal number of $6/0.9 = 7$ per group.

For every experimental group, we will also add a sham group to investigate if the surgery itself has an effect on the outcome measures.

Thus the total number of animals is

Experiment set 1: 10 surplus mice (mixed male and female)

Experiment set 2: (2 strains (KO + wildtype) x 2 treatments (ischemia + sham)) x 2 sexes x 7 per group = 56

Experiment set 3: (2 strains (KO + wildtype) x 2 treatments (ischemia + sham)) x 2 sexes x 7 per group = 56

Experiment set 4: (2 strains (KO + wildtype) x 2 treatments (ischemia + sham)) x 2 sexes x 7 per group = 56

Total= 178 mice

Dierproef

8. Experiment

Aim experiment set 1: To establish the method of injection microspheres in the mouse, finding the right way to inject and the right amount to inject.

Aim experiment set 2: To investigate the role of NOX4, and possible gender-differences therein, in angiogenesis and tissue damage after chronic ischemia

Aim experiment set 3: To investigate the role of NOX2, and possible gender-differences therein in angiogenesis and tissue damage after chronic ischemia and compare these results with exp set 1 and 3

Aim experiment set 4: To investigate the role of NOX, and possible gender-differences therein 1 in angiogenesis and tissue damage after chronic ischemia and compare these results with exp set 1 and 2.

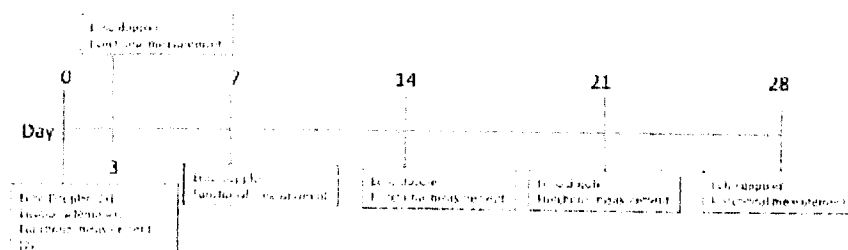
Experiment set 1: To establish the method, on 1 day the following experiments will be done under isoflurane anesthesia:

- Doppler blood flow measurement according to SOP 'LDI metingen met de perimed voor de muis' of the department of physiology
- Cannulation of the a.carotis and two subsequent injections of microspheres, one bolus injection, thereafter one slow infusion.
- Ligation of the femoral artery, according to SOP 'Ischemisch achterpoot model' of the department of physiology
- Doppler blood flow measurement post-surgery
- Two injections of microspheres, one bolus and 1 slow infusion
- Sacrificing of the animal by anesthetics overdose and harvesting of tissues

In experiment sets 2, 3, and 4, the set-up will be as follows:

- day 0:
 - o Doppler flow measurement under isoflurane anesthesia, followed by ligation of the femoral artery and another post-doppler flow measurement, according to the SOP's used by the department of physiology.
- Day 3/7/14/21/28: Doppler flow measurement under isoflurane anesthesia and measuring the functional usage of the hindlimbs with the 'catwalk' (functional measurement, mouse needs to walk over a glass plate).
- Day 28: Terminal measurements under isoflurane anesthesia. Via a catheter in the carotid artery we will inject microspheres. We will also measure the blood flow to the leg with a flow probe placed on the abdominal aorta. Animals will thereafter be sacrificed by an overdose of isoflurane and organs will be collected for further analysis.

Timeline:



The timeline above indicates the most ideal experiment, but due to practical reasons we will do the

mentioned experiments on the day mentioned with a range of 1 days before and 1 days after. (thus day13-15 for day 14)

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

In all experiments anesthesia (and analgesia) will be applied according to the approved SOPs. The surgery and all the Doppler blood flow measurements will take place under isoflurane anesthesia, induction with 3-4%, then maintenance with 2-2.5%.

9b. Pijnbestrijding

Analgesia will be performed according to the approved SOPs. Buprenorphine will be used as analgesic instead of NSAID's. NSAID's not only have an analgesic effect but also an anti-inflammatory effect. The processes of oxidative stress and angiogenesis are intertwined with inflammation. Since we want to study the effects of the NOX isoforms on oxidative stress, angiogenesis and remodeling, the use of NSAID's would interfere with our measurements. 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 once daily and monitored for signs of illness and discomfort (e.g. passive behaviour also at approaching, lack of grooming, > 15 % weight loss, skin/fur condition). After ligation of the femoral artery, a severe complication is necrosis of the toes/leg, which can occur within the first 5 days after surgery. This necrosis should heal in the following weeks due to revascularization[12]. Should necrosis occur and not be improved after the first week post-surgery, contact the responsible investigator and the art 14 animal welfare officer for advice on painkilling or sacrificing (immediate sacrificing when necrosis occurs would result in a bias in the results). Should other severe discomfort signs or automutilation of the toes be observed, the animals will be sacrificed by applying a pentobarbitone overdose (200 mg/kg i.p, diluted 1:10).

10a. Ongerief



Nature of intervention	Approximate Duration	Frequency	Discomfort
Exp set 1			
Doppler blood flow under isoflurane anesthesia	15 min	2	3
Cannulation of a. carotis and injection of microspheres	5 min	2	2
Ligation of the femoral artery	20 min	1	3
Exp set 2,3,4: exp animals			
Doppler blood flow under isoflurane anesthesia	15 min	7	3
Functional measurement	10 min	7	2
Cannulation of a. carotis and injection of microspheres under isoflurane anesthesia	5 min	1	2
Ligation of the a. femoralis	20 min	1	3
Living after ligation of a. femoralis	4 weeks	1	4
Exp set 2,3,4: sham animals			
Doppler blood flow under isoflurane anesthesia	15 min	7	3
Functional measurement	10 min	7	2
Cannulation of a. carotis and injection of microspheres under isoflurane anesthesia	5 min	1	2
Sham surgery mimicking the ligation surgery without real ligation	20 min	1	2
Living after sham surgery	4 weeks	1	2

Cumulatively the total discomfort is **code 04**. For the sham animals and the animals in the pilot, the total discomfort will be 3.

10b. Welzijnsevaluatie

As said, the mice will be regularly inspected for signs of illness or serious discomfort. We know from the literature that there is a risk of acute necrosis of the leg/toe. During the first 5 days after surgery, animals will be inspected daily therefore. The department of _____ has performed this kind of surgery on numerous occasions and very rarely saw this complication. Should necrosis nevertheless occur and not improve or if automutilation occurs, the animal will be sacrificed as specified under 9. Should other signs of illness, discomfort or disease occur, the Article 14 animal welfare officer will be contacted.

11. Verzorging en huisvesting

Surgery and recovery in a special heated room will take place in the animal lab of _____ or _____. Thereafter animals will be housed socially at the CPV with food and water ad libitum and cage enrichment. On day 3,7,14,21 and 28 a Doppler blood flow measurement and a functional measurement will be performed at the animal lab of _____ or _____. In case of questions or problems (e.g. the observation by the CPV that an animal's condition is getting worse), an article 12 person of the animal lab of _____ may be contacted or the responsible article 9 researcher.

12. Deskundigheid

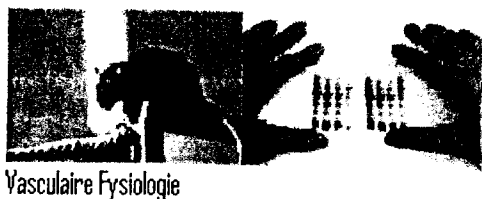
All other animal handling procedures will be conducted by experienced article 12 staff or by article 9 staff (under supervision of article 12 staff). The involved article 12 staff has previously conducted similar experiments on numerous occasions.

13. Standard Operation Procedures (SOP) (see attachments)

- Ischemisch achterpoot model-
- SOP- Cannulatie van de a.carotis ten behoeve van injecties-

Relevante literatuur

1. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313 (2007).
2. Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med*, 43(3), 332-347 (2007).
3. McNally JS, Davis ME, Giddens DP *et al.* Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(6), H2290-2297 (2003)
4. Tojo *et al.* Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 2005;111:2347-2355
5. Urao *et al.* Role of Nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circulation Research* 2008;103:212-220
6. Distasi *et al.* Suppressed hindlimb perfusion in Rac2^{-/-} and Nox2^{-/-} mice does not result from impaired collateral growth *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H877-H886, 2009
7. Haddad *et al.* Nox2-containing NADPH oxidase deficiency confers protection from hindlimb ischemia in conditions of increased oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1522-1528
8. Craige *et al.* NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation* 2011;124:731-740
9. Miller *et al.* Effects of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2007) 34, 1073-1043
10. Dantas *et al.* Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovascular research* 61(2004) 22-29
11. Miller *et al.* Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. *Stroke* 2007, 38: 2142-2149
12. Hofer *et al.* Direct evidence for tumor necrosis factor- α signaling in arteriogenesis. *Circulation* 2002, 105:1639-1641
13. Johnson *et al.* Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularisation of ischemic tissues. *Circ Res* 2004;94:262-268
14. Couffignal *et al.* Mouse model of angiogenesis. *Am J Path* 1998; 152:1667-1679



SOP Ischemisch achterpoot model, ligatie a.femoralis

- **voorwoord:**

dit protocol is bedoeld om de ligatie van de arterie Femoralis en de arterie Epigastrica zo goed mogelijk te zetten. De chirurgische ingrepen worden onder aseptische condities uitgevoerd. Dit protocol is reeds goedgekeurd en wordt toegepast in alle ischemische achterpootingrepen bij de afdeling

Sedatie en narcose:

Analgesie: temgesic 0.1mg/kg 15-30 minuten voor de ingreep

Isofluraan 3-4% om de muis onder narcose te krijgen daarna 2-2.5% om de muis onder narcose te houden tijdens de Laser-Doppler metingen. Ingrepen worden gestart na negatieve reactie op pijnprikkels (voetzool- en ooglidreflex), een rustige ademhaling en hartslag.

Indien de muis goed onder de narcose is, volgen de volgende stappen:

Preoperatieve Laser-Doppler meting:

- Scheer de dijbenen en omliggende gebieden van het dier goed kaal
- Fixeer de muis in supine positie met tape op de verwarmde plaat van de Laser-Doppler (instelling 42.0°C) en zet de warmtekamer over de muis heen. Laat hem 10 minuten opwarmen.
- Stel de Laserdopler in
- Open een nieuwe meting en start de scan.

Ligatie a.femoralis:

1. Haal de Rat/muis uit de Laser-Dopler en breng deze naar je operatie tafel.
2. Leg het dier aan de isofluraan 2% (flow 0.2L/min)
3. Fixeer de muis in supine positie op de verwarmde operatieplaat
4. Breng de rectumprobe in voor temperatuurcontrole
5. Desinfecteer met jodium het middengedeelte van de rechterachterpoot- en lies.
6. Maak een kleine incisie (± 0.5 cm) aan de mediale zijde van de rechter dij vanaf het ligamentum inguinale tot net boven de patella.
7. Prepareer met fijne puncetten de a.femoralis en de a.epigastrica vrij tussen de 'superficial circumflex' en de 'caudofemoralis' en scheidt de arterie van de vene en zenuwweefsel
8. Ligeer vervolgens de a.femoralis en de a.epigastrica (om shuntvorming te voorkomen) distaal van de a.profunda femoris met zijde 6-0 en plaats 5mm distaal hiervan een tweede ligatuur
9. Sluit vervolgens de huid met polysorb 4-0 doorlopend



Postoperatieve Laser-Doppler meting:

- Leg de muis op de warmteplaat van de Laser-Doppler en zet de kap over de muis heen (2% isofluraan). Laat het dier 10 minuten opwarmen.
- Stel de Laser-Doppler in.
- Open een nieuwe meting en start de scan.

Postoperatieve zorg

- Dien subcutaan Temgesic 0.1mg/kg toe
- Laat het dier bijkomen bij 37°C



Art. 12 J
Art. 12
Art. 12
Art. 12
Art. 09 I

tel:

SOP 14-N Ongerief 02

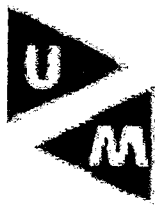
Cannulatie van de arteria carotis ten behoeve van injecties (terminaal experiment)

Narcose :

Isofluraan: inductie 3-4%, onderhouden met 2-2.5%

als de muis goed onder narcose is :

- de hals scheren en desinfecteren met jodium
- de muis op een warmhoudplaat leggen met een temperatuur probe in het rectum, deze wordt verbonden met een thermostatisch verwarmingsselement om de lichaamstemperatuur op 37°C te houden
- de rechter arterie carotis vrijprepareren
- met een iris schaartje een kleine opening in de art. Carotis maken en een cannule opschuiven tot in de aortaboog
- injectie van een substantie kan nu geschieden dmv een bolusinjectie of langzame infusie waarbij de substantie zich zal vermengen met het bloed dat net uit het linkerventrikel komt. De substantie zal zich dus direct en snel door de hele circulatie verspreiden
- na injectie/infusie kan de muis worden opgeofferd dmv verbloeding of isoflurane overdosering waarna weefsels kunnen worden uitgenomen voor verdere analyse



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, 28-09-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*NADPH oxidases in angiogenesis: the effects of NOX1, NOX2 and NOX4 in a model of chronic peripheral ischemia*", is op de DEC vergadering van 23 september 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC merkt op dat het geslacht van groep 1 op het voorblad niet overeenstemt met 7c. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC verzoekt de shamgroepen in aparte kolommen op het voorblad te vermelden daar het ongerief anders is van deze groepen.
- De DEC is van mening dat een gefaseerde proefopzet hier van toepassing is, aangezien de te onderzoeken verschillen, betreffende het effect van geslacht, nog niet vaststaan. Pas als dit het geval is, is het zinvol de knockout dieren ook aan deze vergelijking te onderwerpen.
- Punt 10a- De DEC is van mening dat het ongerief van de "ligation of the femoral artery" en de "doppler blood flow under isoflurane anestesia" (7x) code 03 is. De DEC verzoekt dit aan te passen en in overeenstemming te brengen met het voorblad.
- De DEC verzoekt bij de humane eindpunten de "automutilatie van de tenen" ook te vermelden.
- In verband met de WOB verzoekt de DEC de namen uit het onderzoeksplan te verwijderen.
- Punt 9a- De DEC merkt op dat de hoeveelheid isofluraan 3-4% moet zijn en verzoekt dit in de aanvraag en de SOP aan te passen.

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

Project 2011-119

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer **2011-119**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



Aan: DEC UM

03/10/2011, Maastricht

Betreft: DEC aanvraag 2011-119

Geachte DEC-leden,

Mijn projectaanvraag: *NADPH oxidases in angiogenesis: the effects of NOX1, NOX2 and NOX4 in a model of chronic peripheral ischemia* is op de DEC vergadering van 23 september besproken.

De DEC had onderstaande opmerkingen:

- De DEC merkt op dat het geslacht van groep 1 op het voorblad niet overeenstemt met 7c. De DEC verzoekt dit aan te passen → Het geslacht van groep 1 is op het voorblad aangepast naar M+V.
- De DEC verzoekt de shamgroepen in aparte kolommen op het voorblad te vermelden daar het ongerief anders is van deze groepen. → Op het voorblad zijn de verschillende sham-groepen als aparte groepen aangegeven met een totale ongeriefscore van 3.
- Punt 10a- De DEC is van mening dat het ongerief van de “ligation of the femoral artery” en de “doppler blood flow under isoflurane anesthia” (7x) code 03 is. De DEC verzoekt dit aan te passen en in overeenstemming te brengen met het voorblad. → De ongeriefcores van ‘ligation of the femoral artery’ en ‘doppler blood flow under isoflurane anesthesia’ zijn aangepast naar code 03. De totale score zoals vermeld op het voorblad is nu code 04 voor de experimentele groepen, code 03 voor de sham-groepen en code 03 voor de pilotgroep.
- De DEC verzoekt bij de humane eindpunten de “automutilatie van de tenen” ook te vermelden. → Autmutilatie van de tenen is toegevoegd als humaan eindpunt en als punt voor observatie bij de controle van de dieren.
- In verband met de WOB verzoekt de DEC de namen uit het onderzoeksplan te verwijderen → de verschillende namen zijn verwijderd uit het protocol en waar nodig vervangen door ‘ verantwoordelijk onderzoeker’.
- Punt 9a- De DEC merkt op dat de hoeveelheid isofluraan 3-4% moet zijn en verzoekt dit in de aanvraag en de SOP aan te passen. → zowel in het protocol als in de SOP is de hoeveelheid isofluraan voor inductie van de narcose aangepast van 4-5% naar 3-4%.

Daarnaast had de DEC de volgende opmerking:

- De DEC is van mening dat een gefaseerde proefopzet hier van toepassing is, aangezien de te onderzoeken verschillen, betreffende het effect van geslacht, nog niet vaststaan. Pas als dit het geval is, is het zinvol de knockout dieren ook aan deze vergelijking te onderwerpen.

Uiteraard zou een gefaseerde opzet van toepassing zijn indien we puur willen kijken naar het verschil tussen man en vrouw. Echter, onze primaire uitkomstmaat is het verschil tussen KO en WT. In de literatuur is beschreven dat de angiogenese beïnvloedt kan worden door hormonen, daarnaast is er ook bewijs dat mannetjes en vrouwtjes verschillend reageren op de knock-down van de NADPH-oxidases. Zowel het genotype alsook het geslacht kan dus de experimenten beïnvloeden en mogelijk is er zelfs een interactie tussen de twee. Als er dus geen verschillen zijn tussen WT mannetjes en vrouwtjes, wil dat nog niet zeggen dat er ook geen verschil is tussen KO mannetjes en vrouwtjes. Daarnaast willen we zoals gezegd als primair punt kijken naar verschillen tussen de genotypes, zowel bij mannetjes als bij vrouwtjes. De KO vrouwtjes zullen dan ook eveneens gebruikt moeten worden om deze vergelijking te kunnen maken, ongeacht van het verschil tussen man en vrouw. Het is dus in dit geval niet mogelijk gebruik maken van een gefaseerde opzet. Daar dit blijkbaar nog niet voldoende duidelijk was, is dit ook nogmaals in het nieuwe DEC-voorstel verwerkt.

Hopende hiermee te hebben voldaan aan de gevraagde wijzingen van de DEC, verblijf ik,

Met vriendelijke groet,

Dept. , room
Tel.

From: Dec Secretariaat
Sent: donderdag 13 oktober 2011 8:50
To:
Subject: FW: aangepaste versie DEC voorstel 2011-119
Attachments: DECproposal 2011-119.doc; Sept2011-aangepast.doc; Wijzigingsbrief project

Geachte onderzoeker, beste

De DEC heeft de herziene bekeken en heeft nog de volgende opmerking:

De opmerking van de DEC was:

* De DEC is van mening dat een gefaseerde proefopzet hier van toepassing is, aangezien de te onderzoeken verschillen, betreffende het effect van geslacht, nog niet vaststaan. Pas als dit het geval is, is het zinvol de knockout dieren ook aan deze vergelijking te onderwerpen.

-Uit jouw antwoord blijkt dat ook eventuele verschillen in geslacht onderzocht zullen gaan worden, hetgeen het aantal muizen bijna verdubbelt. Hiervoor dient een onderbouwing in de wetenschappelijke paragraaf te worden opgenomen. Daarnaast dient dit ook te worden vermeld in de doelstelling van het experiment.

De DEC verzoekt je dit aan te passen.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616- , 6200 MD Maastricht
T
E-mail: :

Werktijden:

From: t
Sent: maandag 3 oktober 2011 10:55
To: Dec Secretariaat
Subject: Re: aangepaste versie DEC voorstel 2011-119

Beste

Bij deze de aangepaste DEC met aangepaste brief waarin de vragen zijn beantwoord.

Met vriendelijke groet,

}

Department
Faculty of Medicine, Health & Life Science

13-10-2011



Aan: DEC UM

20/10/2011, Maastricht

Betreft: DEC aanvraag 2011-119

Geachte DEC-leden,

Mijn projectaanvraag: *NADPH oxidases in angiogenesis: the effects of NOX1, NOX2 and NOX4 in a model of chronic peripheral ischemia* is op de DEC vergadering van 23 september besproken. Na enkele wijzigingen had de DEC nog de volgende opmerking:

'De opmerking van de DEC was:

De DEC is van mening dat een gefaseerde proefopzet hier van toepassing is, aangezien de te onderzoeken verschillen, betreffende het effect van geslacht, nog niet vaststaan. Pas als dit het geval is, is het zinvol de knockout dieren ook aan deze vergelijking te onderwerpen.

Uit jouw antwoord blijkt dat ook eventuele verschillen in geslacht onderzocht zullen gaan worden, hetgeen het aantal muizen bijna verdubbelt. Hiervoor dient een onderbouwing in de wetenschappelijke paragraaf te worden opgenomen. Daarnaast dient dit ook te worden vermeld in de doelstelling van het experiment.

De DEC verzoekt je dit aan te passen'

Uit de literatuur hebben wij aanwijzingen dat zowel de reactie op oxidatieve stress en reactieve zuurstof alsook de activatie en functie van NADPH oxidasen kan verschillen binnen de twee geslachten. Het is dus nodig om zowel mannetjes als vrouwtjes voor onze studie te maken om bij een mogelijk latere translatie naar de kliniek rekening te kunnen houden met deze verschillen. De therapie voor mannen en vrouwen zou dan verschillend kunnen zijn.

Bovenstaande redenering is ook verwerkt in het wetenschappelijk deel van de het DEC voorstel en in het doel van de proef.

Hopende hiermee te hebben voldaan aan de gevraagde wijzigingen van de DEC, verblijf ik,

Met vriendelijke groet,

Dept.
Tel.

room

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
27-10-2011

Project: *NADPH oxidases in angiogenesis: the effects of NOX1, NOX2 and NOX4 in a model of chronic peripheral ischemia.*

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

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-119
Diersoort: muis
Aantal dieren: 178
Einddatum: 26-10-2015

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