

|            |                                                                                     |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
|            | <b>Inventaris Wob-verzoek W15-08</b>                                                |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|            |                                                                                     |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|            |                                                                                     | <b>wordt verstrekt</b> |             |               | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |               |             |
| <b>nr.</b> | <b>document</b>                                                                     | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b>             | <b>10.1.c</b> | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |
|            | <b>NTSAVD2015129, Evaluatie en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie.</b> |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
| 1          | projectvoorstel                                                                     |                        |             |               | x                        | x             |               | x             |             |
| 2          | ontvangstbevestiging                                                                |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 3          | Niet technische samenvatting                                                        | x                      |             |               |                          |               |               |               |             |
| 4          | Dec advies                                                                          |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 5          | bijlage beschrijving dierproef 1                                                    |                        |             |               | x                        | x             |               | x             |             |
| 6          | bijlage beschrijving dierproef 2                                                    |                        |             |               | x                        | x             |               | x             |             |
| 7          | aanvraag projectvergunning                                                          |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 8          | mail vraag aan DEC dd 8-6-2015                                                      |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 9          | mail aanvullende vragen dd 8-6-2015                                                 |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 10         | aangepast projectvoorstel                                                           |                        |             |               | x                        | x             |               | x             |             |
| 11         | bijlage dieproeven versie 3                                                         |                        |             |               | x                        | x             |               | x             |             |
| 12         | interne mail van finance betaling binnen dd 8-7-2015                                |                        | x           |               |                          |               |               |               | x           |
| 13         | interne mail over dubbele betaling dd 8-7-2015                                      |                        | x           |               |                          |               |               |               | x           |
| 14         | mail aan onderzoeker over wijziging aanvraagnummer dd 15-6-2015                     |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 15         | brief antwoorden onderzoeker                                                        |                        |             |               | x                        |               | x             |               |             |
| 16         | advies aan CCD                                                                      |                        | x           |               |                          |               |               |               | x           |
| 17         | beschikking                                                                         |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |



## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☒ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

---

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
  - Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
  - Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.
- 

#### AANLEIDING

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige, progressieve en irreversibele longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodelering, welke uiteindelijk leidt tot progressieve obstructie van de long arteriolen. Het histologisch beeld van de vaatlaesies in PAH is inmiddels goed in kaart gebracht, maar het onderliggende mechanisme wordt nog onvoldoende begrepen.

PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een congenitale hartafwijking (PAH-CHD). Het is bekend dat correctie van deze hartafwijking in een vroeg (reversibel) stadium van de ziekte kan leiden tot volledig klinisch herstel en regressie van de vaatlaesies. Te late correctie, in een irreversibel stadium van de ziekte, kan echter leiden tot versnelde ziekteprogressie en de dood. Het is voor de keuze en timing van interventie in PAH-CHD daarom essentieel de progressie en het stadium van de ziekte goed in kaart te brengen. Huidige diagnostische technieken blijken echter nog onvoldoende betrouwbaar om het onderscheid te maken tussen reversibele en irreversibele PAH, en zijn bovendien invasief en belastend voor het (jonge) kind.

Wanneer PAH-CHD irreversibel is, is longtransplantatie (LTx) momenteel de enige mogelijkheid tot genezing. Huidige behandelstrategieën kunnen de ziekteprogressie slechts vertragen, maar niet volledig stoppen of omkeren. PAH-CHD is hiermee nog steeds een dodelijke ziekte die al op jonge leeftijd kan leiden tot rechter hart falen (RHF) en de dood.

Samengevat: Er is nog onvoldoende kennis over de mechanismen van (de progressie van) longvaatremodelering in PAH-CHD. We kunnen de ziekteprogressie bovendien nog niet betrouwbaar volgen in de individuele patiënt en weten niet wanneer de ziekte irreversibel is. De progressie van irreversibele PAH-CHD, evenals alle andere vormen van PAH, kan momenteel slechts beperkt worden vertraagd, en niet worden genezen.

#### ACHTERGROND

PAH uit zich meestal al op jonge leeftijd en de gemiddelde levensverwachting is momenteel 3-5 jaar. PAH kent verschillende oorzaken: erfelijk, medicatie/toxinegeïnduceerd of als complicatie van aangeboren hartafwijkingen (CHD) of infecties zoals HIV; soms blijft de oorzaak onbekend. Alle vormen van PAH worden gekenmerkt door eenzelfde patroon van progressieve en irreversibele vaatafwijkingen in de longarteriën, welke zorgen voor een stijging van de longvaatdruk en weerstand. Het klinisch probleem dat PAH momenteel geeft is tweeledig: Het primaire ziekteproces (vasculaire remodeling) kan 1) onvoldoende betrouwbaar worden beoordeeld en 2) slechts beperkt worden geremd. De sleutel in het oplossen van dit probleem ligt primair in het beter begrijpen van de mechanismen betrokken bij de progressie en reversibiliteit van vasculaire remodeling in PAH.

PAH-CHD, of flow-PAH is een ideale subklasse van PAH om ziekteprogressie en reversibiliteit te onderzoeken door 2 unieke eigenschappen:

---

- 1) PAH-CHD is de enige vorm waarbij we de pathogene trigger kennen en kunnen kwantificeren.
- 2) PAH-CHD is de enige vorm die een reversibele fase kent.

1) De vaatafwijkingen in PAH-CHD ontwikkelen als gevolg van een toegenomen of abnormale flow en druk in de pulmonale circulatie, die voorkomt bij veel aangeboren hartafwijkingen. Eerder in ons lab is in ratten aangetoond dat een toegenomen pulmonale flow leidt tot verdikking van de spierlaag (mediahypertrofie) om de longarteriën (vroeg stadium PAH). Bij ziekteprogressie zien we dat ook de endotheellaag (intima) gaat verdikken, waardoor het vat dichtgroeit (neo-intimalaësie, eind stadium PAH) [van Albada, Dickinson, resp. 2008, 2011].

De meest ingrijpende veranderingen op cellulair niveau vinden plaats in de endotheelcellen van deze (neo)intima.

2) Ook een reversibele fase is vooralsnog uniek voor PAH-CHD. Het normaliseren van abnormale pulmonale hemodynamiek (de trigger), door het corrigeren van het hartdefect, kan in een vroeg, reversibel stadium PAH leiden tot regressie van de vaatafwijkingen en volledig klinisch herstel. Wanneer de correctie van het hartdefect plaatsvindt in het irreversibele stadium, zal de longvaatziekte desondanks voortschrijden. Deze laatste groep kinderen blijkt een nog slechtere prognose te hebben dan wanneer het hartdefect open gelaten wordt. Beter begrip van het effect van hemodynamische normalisering op de pulmonale vaatremodelering in verschillende ziektestadia kan helpen in het ontrafelen van de mechanismen die specifiek betrokken zijn bij reversibiliteit. Dit voorkomt dat kinderen met PAH-CHD onterecht niet of wel worden geopereerd. Tevens kan dit leiden tot nieuwe targets voor farmacologische interventie in PAH-CHD en mogelijk in alle overige vormen van PAH.

Essentieel voor de timing van deze farmacologische interventie (in PAH) of van hemodynamische normalisatie (in PAH-CHD), is dus een betrouwbare inschatting van het ziektestadium. De beoordeling hiervan wordt momenteel gemaakt op basis van een combinatie van klinische parameters en hemodynamische onderzoeken zoals echografie en rechter hart katheterisatie. Geen van deze technieken kan echter betrouwbare informatie geven over het primaire ziekteproces en haar reversibiliteit. PET-CT onderzoek zou een mogelijkheid kunnen bieden om vaatremodelering in vivo in beeld te brengen. De eerste studies met de conventionele 18F-FDG PET tracer in PAH zijn reeds gepubliceerd [marsboom, zhao, resp. 2011, 2014] en geven aanleiding tot het testen van nieuwe PET tracers, specifiek voor vasculaire remodelering.

#### VOORGAAND ONDERZOEK:

Er is reeds 10 jaar ervaring met diermodellen voor PAH-CHD op de afdeling CCH-UMCG [van Albada, Dickinson 2005-2014].

De klinische, hemodynamische en histologische progressie van flow-PAH is inmiddels goed in kaart gebracht.

Vroeg stadium MCT/flow-PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door geïsoleerde mediahypertrofie en een slanke intimalaag met kenmerken van hyperproliferatie en verhoogde apoptose. Gevorderd stadium PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door mediahypertrofie en een verdikte (neo)intima laag, met kenmerken van apoptose-resistentie. Beide fasen zijn overeenkomstig met de humane PAH-CHD. Dit model (Ia) wordt nogmaals beschreven onder paragraaf 3.4.2.

#### Context

Centraal bij dit onderzoek staat het doel om de prognose en kwaliteit van leven van patiënten met PAH te verbeteren.

UMCG heeft als missie iedereen gezond oud te laten worden, ondanks de aanwezigheid van chronische aandoeningen als PAH. Dit onderzoek is een belangrijk onderdeel van een landelijke onderzoek naar nieuwe therapieën voor PAH (PHAEDRA, een samenwerking van het UMCG met de VU (Prof. [REDACTED]), LUMC (Prof. [REDACTED]), en het Erasmus MC (Prof. [REDACTED]).

Recente, relevante Literatuur PAH algemeen:

Berger RM, Beghetti M, Humpl T, Raskob GE, Ivy DD, Jing ZC, et al. Clinical features of paediatric pulmonary hypertension: a registry study. *Lancet* 2012 Feb 11;379(9815):537-546.

Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 Aug 1;186(3):261-272.

Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010 Dec;43(6):629-634

Manes A, Palazzini M, Leci E, Bacchi Reggiani ML, Branzi A, Galie N. Current era survival of patients with pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease: a comparison between clinical subgroups. *Eur Heart J* 2014 Mar;35(11):716-724.

Zhao L, Ashek A, Wang L, Fang W, Dabral S, Dubois O, et al. Heterogeneity in lung (18)FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic (18)FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodeling targeted treatments. *Circulation* 2013 Sep 10;128(11):1214-1224.

Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Pechoux C, Bogaard HJ, et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2015 Jan 15.

Literatuur diermodellen flow-PAH (UMCG):

van Albada ME, Schoemaker RG, Kemna MS, Cromme-Dijkhuis AH, van Veghel R, Berger RM. The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005 Sep;26(3):487-493.

Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, Berger RM. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013 Jul 1;305(1):L1-14.

Dickinson MG, Bartelds B, Molema G, Borgdorff MA, Boersma B, Takens J, et al. Egr-1 expression during neointimal development in flow-associated pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 2011 Nov;179(5):2199-2209.

Dickinson MG, Kowalski PS, Bartelds B, Borgdorff MA, van der Feen D, Sietsma H, et al. A Critical Role for Egr-1 during Vascular Remodelling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiovasc Res* 2014 Jul 14.

Literatuur diermodellen longtransplantatie (UMCG) (enkele recente voorbeelden)

Munneke AJ1, Rakhorst G, Petersen AH; Flush at room temperature followed by storage on ice creates the best lung graft preservation in rats. *Transpl Int*. 2013 Jul;26(7):751-60. doi: 10.1111/tri.12113.

Zweers N, Petersen AH. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation*. 2004 Nov 15;78(9):1251-8.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het doel van dit project is globaal in te delen in 3 hoofdpeilers:

1. Het ontrafelen van de pathobiologie van PAH, zowel op genetisch, moleculair, cellulair, histologisch niveau. En specifiek: karakteriseren van de rol van de TGF- $\beta$  / BMP-as in respons op veranderingen in druk en flow.
2. Het karakteriseren van Reversibiliteit in PAH-CHD. Wat is het effect van normalisering van de pulmonale hemodynamiek op PAH longen; en tot welk tijdstip is de ziekte nog reversibel? Is er een point of no return? Wat zijn de mechanismen die hierbij een rol spelen?
3. Het ontdekken van nieuwe strategieën om de ziekte invasief en non-invasief te kunnen volgen en te stadiëren door het zoeken naar nieuwe biomarkers en toepassen van in vivo imaging technieken als PET-CT.
4. Farmacologische interventie op pathogene targets gevonden onder doel 1 en 2, die kunnen leiden tot een nieuwe behandeling voor PAH.

AD 1. Om de pathobiologie van PAH te ontrafelen zijn we van plan endotheelcellen te isoleren uit het MCT/flow-ratmodel (model Ia, paragraaf 3.4.2.) in verschillende stadia van de ziekte. [REDACTED]

[REDACTED] die specifiek aangrijpen op het veranderde fenotype dat de endotheelcel heeft verkregen tijdens ziekteprogressie. Deze drugscreen wordt uitgevoerd in samenwerking met het LUMC. Het weefsel en bloed dat niet gebruikt wordt voor de endotheelcelisolatie, wordt gebruikt om de spatiotemporele expressie (histologie) of waarde als biomarker (bloed) van nieuwe targets te onderzoeken. [REDACTED]

AD 2. Om de reversibiliteit van flow-PAH te onderzoeken zijn we momenteel bezig een model te ontwikkelen voor hemodynamische normalisatie in verschillende stadia van de ziekte. (model II, paragraaf 3.4.2.). [REDACTED]

[REDACTED] Dit simuleert de situatie van het sluiten van een hartdefect bij kinderen met PAH-CHD, waarbij de ziekte soms regressief en soms progressief is. Dit ratmodel geeft ons de mogelijkheid te bepalen (primair op long histologisch niveau) in welk stadium de ziekte nog reversibel is, en welke mechanismen betrokken zijn bij regressieve, dan wel progressieve ziekte. Specifiek [REDACTED]

AD 3. We hebben als doel het primaire remodeleringsproces in de longvaten bij ratten met verschillende stadia van PAH minimaal invasief en in vivo in beeld te brengen. We zullen hiertoe minimaal 2 PET-tracers testen in het bekende MCT/Flow ratmodel. (model Ia en Ib, paragraaf 3.4.2.) We testen al bestaande tracers die hun oorsprong hebben in de oncologie en in PAH een nieuwe toepassing zouden kunnen vinden. [REDACTED]

Het bloed dat gestandaardiseerd verzameld wordt in alle dierproeven in de context van PAH zal gebruikt worden om nieuwe bloed biomarkers te vinden die in relatie staan tot de functionele en structurele veranderingen in het pulmonale vaatbed, of het collateraal aangedane rechter ventrikel.

AD 4. De studies uit doel 1 en de nationale samenwerkingen binnen het PHAEDRA consortium hebben als doel nieuwe targets te vinden voor de behandeling van PAH. Er wordt momenteel een grootschalige drugscreen uitgevoerd om te evalueren of al bestaande farmaca toegepast zouden kunnen worden in de behandeling PAH. [REDACTED] We hebben hier als doel het gekozen farmacon in vivo te testen in het MCT/flow ratmodel (model Ia en b), zowel preventief als bij gemanifesteerde ziekte. Tevens beogen wij het farmacon te testen in het transplantatiemodel (model II) beschreven onder doel 1b (als add-on therapie naast hemodynamische normalisatie). Er is binnen onze onderzoeksgroep reeds ervaring met het geven van therapie in ratmodellen voor PAH via verschillende toedieningswijzen (Dickinson 2011, 2014).

Voor de uitvoering van deze doelen zijn de volgende specifieke elementen nodig:

1. Een ratmodel voor PAH ontwikkeling als gevolg van een verhoogde pulmonale flow. Een model voor flow-PAH is reeds geoptimaliseerd in de wistar rat, gestandaardiseerd en gekarakteriseerd per ziektefase. [van Albada: Eur resp J 2005, Dickinson: Am J Pathol 2011, Circ res 2014] (model I paragraaf 3.4.2.). In dit model kunnen pathobiologische mechanismen worden onderzocht, kunnen PET-tracers worden getest en kan farmacologische interventie worden toegepast. (model Ia)
2. Een methode om endotheelcellen te isoleren uit rattenlongen met verschillende PAH stadia. Deze methode is reeds geoptimaliseerd.
3. Een methode om tracers te testen in ratten. Het UMCG beschikt over een geavanceerd micro-PET centrum en veel ervaring in de uitvoering van studies met radioactieve tracers in proefdieren.
4. Een ratmodel voor flow-PAH, geschikt voor de transplantatiestudies (doel 1b). Het MCT/Flow model is reeds gekarakteriseerd in de Lewis rat: een inbred rat welke, in tegenstelling tot de Wistar rat, gebruikt kan worden voor transplantatie. (model Ib onder paragraaf 3.4.2.)
5. Een ratmodel voor flow-PAH reversibiliteit. (model II, paragraaf 3.4.2.). Hierbij wordt een PAH-long, (PAH opgewekt in model Ib (element 4)), getransplanteerd in een gezonde ontvanger. [REDACTED]. In dit model kunnen pathobiologische mechanismen specifiek voor reversibiliteit worden onderzocht, kunnen PET-tracers worden getest en kan farmacologische interventie worden toegepast.

Het onderzoek vindt plaats op de afdeling Experimentele Cardiologie [REDACTED]. Hier is uitgebreide expertise in het onderzoeken van cardiovasculaire veranderingen in kleine proefdieren. We kunnen hartfunctie o.a. onderzoeken d.m.v. elektrocardiogram (ECGs), echocardiografie (ECHO), rechter hartcatheterisatie (R-CATH). Daarnaast hebben we een breed scala aan (immuno)histochemische en moleculaire technieken tot onze beschikking om veranderingen tot in alle details te onderzoeken. Voor het uitvoeren van deze specialistische ingrepen hebben we een zeer ervaren biotechnicus op onze afdeling en het centraal dierproef laboratorium (CDL) heeft een microchirurgisch team dat ons hier ook in bijstaat.

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

**MAATSCHAPPELIJK BELANG:** Dit onderzoek vormt een essentieel onderdeel van de PHAEDRA trial. PHAEDRA heeft als doel de toekomst van (jonge) kinderen en volwassenen met PAH te verbeteren, zowel wat betreft de levensduur als de kwaliteit van leven. PAH is een ziekte die zeldzaam is (2,3 per 1.000.000), maar een 5-jaarsoverleving heeft van <50%. Huidige behandelstrategieën kunnen het ziekteproces slechts remmen maar niet genezen. Onnauwkeurige stadiëring (inschatting van reversibiliteit) van het ziekteproces leidt in 2-8% van de patiënten met PAH-CHD tot onterechte sluiting van het hartdefect en daarmee tot een belangrijke verkorting van de prognose van het kind.

**WETENSCHAPPELIJK BELANG:** De proefdierstudies vormen een essentieel onderdeel van de overkoepelende PHAEDRA trial. Zonder deze studies kunnen de wetenschappelijke doeleinden van de gehele trial niet worden behaald. Specifiek zullen de resultaten die voortkomen uit dit project zullen binnen de PHAEDRA trial bijdragen aan:

- 1) Kennis van het mechanisme van ziekteontwikkeling en progressie in PAH (in CHD) en het effect van hemodynamische normalisatie hierop.
- 2) Nauwkeuriger diagnose en stadiëring bij patiënten met PAH, zodat behandeling beter kan worden gekozen en getimed. De alhier onderzochte diagnostische methoden zullen vervolgens in een ander onderdeel van de PHAEDRA trial in mensen worden getest.
- 3) Behandelstrategieën om PAH te voorkomen en te genezen. De farmacologische compounds gevonden in andere onderdelen van de PHAEDRA trial worden

binnen deze projectaanvraag in vivo getest.

Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek is ook gedetailleerd getoetst door (veelal internationale) reviewers bij het aanvragen van subsidie. Op dit moment is dat o.a. de volgende toegewezen subsidie:

### 3.4 Onderzoeksstrategie

#### 3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Er bestaat reeds een rat-model voor flow-PAH en RHF in ons lab.

Uit het bloed of weefsel van deze diermodellen kunnen we cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfologische mechanismen te karakteriseren.

Op deze modellen kunnen we diagnostische interventies toepassen, zoals bloedtesten, echografie, telemetrie, PET-CT, en hartcatheterisatie.

Op deze modellen kunnen we vervolgens ook therapeutische interventies toepassen, enerzijds chirurgisch (bijvoorbeeld longtransplantatie), anderzijds medicamenteus. Dit helpt ons aan de ene kant om de (ir)reversibiliteit van de geremodeleerde longvaten of rechter hartkamer te testen en te begrijpen wat voor mechanismen hier een rol in spelen, en ook om nieuwe medicijnen te ontwikkelen.

#### 3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Onderzoeksstrategie.

Om de doelen zoals beschreven in paragraaf 3.2 te bereiken, zetten wij de volgende lijnen uit binnen dit project. De verschillende lijnen hangen sterk met elkaar samen.

1. Vasculaire celstudies: cellen geïsoleerd uit dieren met verschillende stadia van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia (flow-PAH in de wistar rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD) om de cellen uit te oogsten. De cellen kunnen we doorkweken om 1) gen- en eiwitexpressie te karakteriseren (o.a. Tgf- $\beta$ /BMP-as) en 2) farmacologische compounds te testen, die specifiek aangrijpen op het veranderde fenotype dat de endotheelcel heeft verkregen tijdens ziekteprogressie. Deze drugscreen wordt uitgevoerd in samenwerking met het LUMC. Hieruit zullen een aantal potentiële farmaca volgen, waarvan de beste in vivo getest zullen worden in lijn 5.
2. Pathobiologiestudies. Ontrafelen van de mechanismen of factoren die ten grondslag liggen aan het ontstaan en de progressie van PAH. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia/b (flow-PAH in wistar en/of lewis rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD). Het weefsel en bloed van de ratten wordt gebruikt om de spatiotemporele expressie (histologie) of waarde als biomarker (bloed) van nieuwe targets te onderzoeken. Dit continueert reeds 10 jaar lopend onderzoek naar de pathobiologie van PAH in ons lab. Op basis van deze lijn zal tevens worden bepaald welke PET-tracers in lijn 4 gebruikt zullen worden. De aangrijppunten van de potentiële tracers zullen voorafgaand aan de experimenten in lijn 4 histologisch worden gevalideerd in het longweefsel uit deze lijn.
3. Reversibiliteitsstudies. Het karakteriseren van de (ir)reversibiliteit van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model II (PAH-LTx, een model voor het beloop van PAH-CHD na sluiten van de cardiale shunt cq. natuurlijk beloop van reversibiliteit van PAH-CHD). Verschillende stadia van PAH worden geïnduceerd in de ratten. . De zieke longen komen



zo in een hemodynamisch genormaliseerde omgeving. Dit model bootst sluiting van de cardiale shunt na bij kinderen met PAH en een congenitale hartafwijking. Dit ratmodel geeft ons de mogelijkheid te bepalen (primair op long histologisch niveau) in welk stadium de ziekte nog reversibel is, en welke mechanismen betrokken zijn bij regressieve, dan wel progressieve ziekte. De targets die specifiek geassocieerd zijn met regressieve / progressieve ziekte kunnen dienen als biomarker of als aangrijppunt voor farmacologische interventie, welke prospectief kunnen worden getoetst in lijn 5.

4. Imagingstudies. Imaging en stadiëring van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model I (flow-PAH) en later evt. model II (PAH-Ltx), waarbij de dieren in verschillende stadia van de ziekte een PET-CT scan krijgen. We testen al bestaande tracers die hun oorsprong hebben in de oncologie en in PAH een nieuwe toepassing zouden kunnen vinden. Te denken valt aan tracers voor processen als proliferatie, apoptose en neoangiogenese, die zowel in PAH als in kanker een hoofdrol spelen.

5. Interventiestudies. Interventie op targets die gevonden worden in de Celstudies, Pathobiologiestudies en Reversibiliteitsstudies. [REDACTED]

[REDACTED] De interventiestudies kunnen worden getest in model I (flow-PAH, als monotherapie -preventief of ter genezing/remming- op het natuurlijk beloop van flow-PAH) en II (PAH-LTx, als add-on therapie náást hemodynamische normalisering).

AD1 en 2) Er wordt reeds 10 jaar onderzoek gedaan naar de pathobiologie van PAH in model Ia (flow-PAH). Uit het bloed of weefsel van deze diervormen kunnen we (endotheel)cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfologische mechanismen te karakteriseren. [REDACTED]

AD 3) [REDACTED]

AD4) Op deze modellen kunnen we ook diagnostische interventies toepassen. Diagnostische interventies die reeds geprotocolleerd zijn, zijn elektrocardiogram (ECGs), echocardiografie (ECHO), rechter hartcatheterisatie (R-CATH). Dit is ondersteunende diagnostiek. Ook nieuwe diagnostische technieken, zoals PET-CT kunnen worden toegepast in deze modellen.

AD5) Op deze modellen kunnen we vervolgens ook therapeutische interventies toepassen. De targets voor interventie worden gevonden in de studies naar pathobiologie en reversibiliteit die zowel in dit onderzoek als in het onderzoeksconsortium PHAEDRA gevonden worden. [REDACTED]

[REDACTED] De medicatie kan in beide modellen (Ia/b en II (flow-PAH en PAH-LTx) gegeven worden als [REDACTED]

Er wordt gebruik gemaakt van 2, aan elkaar gerelateerde modellen, beide in de rat.

[REDACTED]

[REDACTED]

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Samenhang tussen onderzoekslijnen (zie 3.4.2):

In lijn 1 wordt de ziekte op celniveau bestudeerd en kan gezocht worden naar targets voor interventie. Deze targets kunnen met specifieke farmaca gestimuleerd of geremd worden. Dezelfde targets worden daarna bestudeerd op histologisch niveau in lijn 2, Hierin worden tevens klinische, hemodynamische en histologische progressie van PAH en RHF gekarakteriseerd en gestadieerd. Deze karakterisatie is onder andere nodig voor de correlatie van de gegevens uit de imagingstudies, lijn 4. In de Reversibiliteitsstudies, lijn 3, wordt vervolgens het effect van normalisering van de hemodynamiek op de longvaatziekte bestudeerd, of het effect van longtransplantatie op het hart. In de interventiestudies, lijn 5, wordt gebruik gemaakt van de targets gevonden in de cel- en pathobiologie en reversibiliteitsstudies. [REDACTED]

Fasering:

De eerste experimenten worden uitgevoerd onder Lijn 1 en 2. Omdat voor de experimenten uit lijn beide longen nodig zijn voor celwerk, en voor de experimenten uit lijn 2 juist de longhistologie van het grootste belang is, kunnen deze lijnen niet in één dierexperiment worden gemanifesteerd. De eerste experimenten uit lijn 1 worden reeds uitgevoerd. De gevonden eitwit/genexpressiepatronen uit lijn 1 kunnen vervolgens specifiek op histologisch niveau worden gevalideerd in de vaatlaesies van longen met PAH (lijn 2).

De gegevens uit lijn 1 en 2 vormen de basis voor experimenten uit lijn 3 en 4. De ziekteprogressie van PAH in de lewis-rat, zoals nodig voor de reversibiliteitsstudies, is reeds goed in kaart gebracht. Ook voor de imagingstudies is met name goede karakterisatie van ziekteprogressie nodig.

Lijn 1,2 en 3 leveren targets op voor farmacologische interventie en vormen hiermee de basis voor lijn 5. Bovendien kan het effect van medicatie in de proeven uit lijn 5, evt in vivo gevolgd worden door gebruik te maken van de resultaten uit lijn 4.

Go/No-Go:

Algemeen:

Binnen het PHAEDRA consortium, waarin dit onderzoek wordt uitgevoerd, worden alle lopende onderzoekslijnen eens per kwartaal geëvalueerd. Hierbij zullen ook tijdens lopende projecten (naar aanleiding van eventuele problemen of vertraging in wetenschappelijke progressie) Go/No-go punten geformuleerd worden.

- Lijn 1+2) De onderzoeksmethode en procedures uit lijn 1 en 2 zijn reeds gevalideerd en lopend. In deze lijn worden geen belemmeringen voor de progressie van het onderzoek verwacht.

- Lijn 3) Voor de reversibiliteitsstudies uit lijn 3 wordt momenteel een pilot uitgevoerd om o.a. de haalbaarheid van de procedures te toetsen. [REDACTED]

- Lijn 4) Ook voor de imagingstudies in lijn 4 wordt momenteel een pilot uitgevoerd, om de technische haalbaarheid en het onderscheidend vermogen van PET-CT in flow-PAH te toetsen. Go/No-Go punten betreffen ook hier 1) de overleving van de ratten tijdens of na de PET-CT scanprocedures en 2) of het

primaire ziekteproces goed met de PET-CT tracers is af te beelden. Dit zal per tracer overlegd worden binnen het PHAEDRA consortium en met de afdeling nucleair geneeskundige beeldvormende technieken van het UMCG.

- Lijn 5) De potentie van de te kiezen farmacologische interventie wordt eerst getoetst in celstudies. Hierna zal deze in de diermodellen I en II worden toegepast. Een No-Go punt zou hierbij kunnen zijn: disproportioneel lijden als gevolg van een onverwachte bijwerking van het farmacon. Tevens is het mogelijk (althans tegen de verwachting in) dat er geen geschikt farmacon gevonden wordt in de drugscreen (lijn1). Te denken valt aan farmaca die de verstoorde Tgf- $\beta$ /BMP-balans effectief kunnen herstellen. Bij onvoldoende verwachte potentie van een farmacon zou deze kunnen lijn vervallen. Het vinden en evalueren van een geschikt farmacon voor de behandeling van PAH is een hoofddoel van het PHAEDRA consortium. De overwegingen voor het kiezen en evalueren van een geschikt farmacon zullen binnen het consortium uitgebreid worden besproken.

---

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------|
| 1          | Flow-PAH       |
| 2          | PAH-LTx        |
| 3          |                |
| 5          |                |
| 6          |                |
| 7          |                |
| 8          |                |
| 9          |                |
| 10         |                |



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
HPC:FA 29  
9713 AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
factuur

Datum 08 juni 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 02 juni 2015 getiteld: Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie.

Het aanvraagnummer dat wij hieraan hebben gegeven AVD105002015129

Gebruik dit nummer als u contact met ons opneemt.

Door technische omstandigheden is het momenteel niet mogelijk om uw automatische incasso te innen. Bijgaand treft u daarom de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te betalen. Het wijzigen van de betalingswijze, zal de behandeling van uw aanvraag niet vertragen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan een eventuele vergunning worden ingetrokken. Uw eenmalige machtiging komt hierbij te vervallen. Onze excuses voor het ongemak.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- Gegevens aanvraagformulier
- [Factuur](#)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
HPC:FA 29  
9713 AV Groningen  
Rijksuniversiteit Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

# Factuur

|               |                                                |
|---------------|------------------------------------------------|
| Factuurdatum  | 08 juni 2015                                   |
| Vervaldatum   | 08 juli 2015                                   |
| Factuurnummer | 15700129                                       |
| Betreft       | Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven |

## Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven  
Betreft aanvraag AVD105002015129

## Bedrag

€ 741,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer (interne RuG code 8007)
2. Titel van het project: Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie
3. Titel van de NTS: Evaluatie en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie.
4. Type aanvraag:
  - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
  - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon   

  - mailadres contactpersoon @umcg.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ☐ ontvangen door DEC **12-05-2015**
  - ☐ aanvraag compleet **12-05-2015**
  - ☐ in vergadering besproken **21-05-2015**
  - ☐ anderszins behandeld **28-05-2015**
  - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot **26-05-2015 - 28-05-2015**
  - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - ☐ aanpassing aanvraag **28-05-2015**
  - ☐ advies aan CCD **01-06-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats

- Aantal aanwezige DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **26-05-2015**
- Strekking van de vraag / vragen

**De DEC vraagt:**

**-Een duidelijker onderverdeling van de doelen**

**-Een betere omschrijving van het wetenschappelijk belang**

**-Een betere omschrijving van de gebruikte specifieke modellen voor de verschillende lijnen**

**-Een betere samenhang, fasering en beschrijving go / no go criteria van de verschillende lijnen**

- Datum antwoord: **28-05-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en):

**De antwoorden hebben geleid tot verbetering van de beschrijving van de aanvraag.**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren **Ja**



4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering **n.v.t.**

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
- ☐ wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) **Ja**

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **essentieel / substantieel** belang. **Het belang van de doelstelling (Onderzoek naar pathofysiologie en behandeling van PAH) wordt door de DEC erkend.**

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **Ja. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en voorzieningen om de doelstelling binnen de gevraagde termijn te realiseren.**

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **n.v.t.**

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

**Bijlage 1: ja**

**Bijlage 2: ja**

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen.**

**Nee. Omdat de aanvragers hemodynamische parameters bestuderen, is er geen vervanging mogelijk voor deze experimenten.**

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt

**Per aangevraagde dierproef beschrijven de aanvragers het aantal aan te vragen dieren. Dat wordt realistisch ingeschat. In voorkomende gevallen worden pilotstudies uitgevoerd om een adequate powerberekening te kunnen uitvoeren. In andere gevallen wordt uitgegaan van bestaande gegevens om een powerberekening te kunnen doen. Aanvragers gebruiken in vitro testen op endotheel cellen van ratten met PAH. Hierop worden therapieën getest, zodat niet elke potentiële therapie in vivo getest hoeft te worden. Er worden go/no go momenten ingebouwd om onnodig proefdier gebruik te voorkomen. De groep waarin aanvrager werkt heeft jarenlange expertise op dit gebied om duplicatie te voorkomen.**

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten

**De aanvragers doen al het mogelijke om verfijning te bewerkstelligen. Dieren worden regelmatig gemonitord via een door hunzelf uitontwikkeld en goed werkend systeem.**

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd

## **D. Ethische afweging**

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren, de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor mens, dier of milieu

**De DEC is van oordeel dat de aangegeven doelen en de daarbij behorende onderzoeksopzet het gebruik van proefdieren rechtvaardigen. Daarbij is rekening gehouden met de potentiële uiteindelijke klinische waarde van het project en met de wijze waarop de onderzoekers de 3V's hanteren. Cardiovasculaire ziekten zijn een veel voorkomend probleem. PAH in het bijzonder is op dit moment niet te genezen.**

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

**X De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt

**Dit besluit is unaniem door de DEC genomen**



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |                             |                |
|-----|--------------------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 10500                       |                |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen |                |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                  | Type dierproef |
|     |                                                  | 1                           | Flow-PAH       |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot neo-intimavorming en irreversibele obstructie van de long arteriolen. Dit zorgt voor een chronisch verhoogde pulmonale vaatweerstand, wat leidt tot rechter hart falen (RHF) en uiteindelijk de dood. PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een aangeboren cardiale systemisch-pulmonale shunt (PAH-CHD). Bij deze kinderen wordt aangenomen dat de toegenomen pulmonale flow en druk -een gevolg van de shunt- een essentiële trigger is voor het ontwikkelen van PAH. Eerder in ons lab is aangetoond dat toegenomen long-arteriële flow en druk ook bij ratten leidt tot de vaatafwijkingen en het geassocieerde rechter ventrikel falen, die de humane vorm van PAH

karacteriseren.

Primaire, reeds gevalideerde uitkomstmaten in dit model:

De ziekteprogressie van PAH kan in vivo gemeten worden door middel van echocardiografie, telemetrie en/of hartcatheterisatie. Ziekte-ernst kan ex vivo worden gemeten op basis van de pulmonale vasculaire longmorfologie en pathologische kenmerken van rechter hartfalen. Deze uitkomstmaten zijn hieronder verder gespecificeerd.

1. Klinische tekenen van rechter kamer dysfunctie, zich uitend in verminderde inspanningstolerantie en veranderingen in activiteit, lichaamsgewicht, perifere circulatie, cyanose, dys- tachypnoe, oedeem en effusie.

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

2. Parameters voor pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie, gemeten m.b.v. echocardiografie en rechter hartcatheterisatie.

Echocardiografische parameters waarmee we de pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie kunnen bepalen zijn o.a.: Pulmonale acceleratietijd, pulmonale vasculaire weerstand, RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies). Voor deze parameters zijn eerder waarden bepaald in rat (Dickinson, Borgdorff 2011-2015, Urashima 2008 e.v.a.).

Rechter hartcatheterisatie wordt gebruikt om de bloeddruk te bepalen in het rechter atrium, rechter ventrikel, de pulmonaal arterie (arteriële pulmonale druk), en de wiggedruk (veneuze pulmonale druk). Daarnaast kunnen druk-volume relaties worden bepaald. Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met (verdenking op) PAH. Tevens kan telemetrie gebruikt worden om rechtsdruk continu te meten, wat tevens een maat is voor PAH.

3. Pulmonale vasculaire morfologie (ex vivo). De histomorfologie van de longarteriën is de gouden standaard in de evaluatie van PAH. Specifiek wordt gekeken naar het soort vasculaire laesie (media hypertrofie, neo-intimalaesie), wand-lumen ratio en occlusiescore. De histomorfologie in verschillende fasen en soorten van PAH is reeds in ons lab gekarakteriseerd (van Albada, van Loon, Dickinson 2005-2014).

4. Maten voor RV-falen (ex vivo). Dit zijn parameters voor rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht (fulton ratio), en/of b) lichaamsgewicht; en parameters voor rechter ventrikel falen: lever-oedeem, gemeten als wet-dry ratio van de onderste leverlobe.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

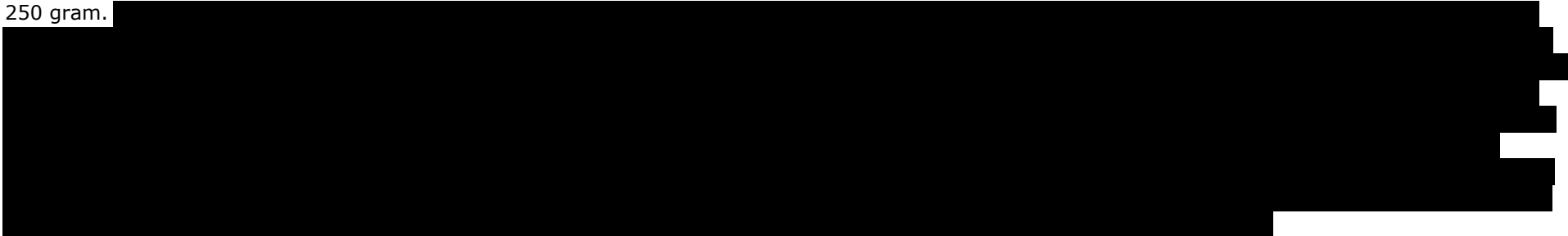
REEDS GESTANDAARDISEERDE BEHANDELING VAN DE DIEREN EN TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Flow-PAH in de rat.

Aard en frequentie van de behandeling: 1 malige injectie met monocrotaline (MCT), gevolgd door een 1 malige chirurgische aanleg van een aorto-cavale shunt.

Duur: De dieren worden op verschillende tijdstippen in de ziekteprogressie geofferd. Zonder behandeling is dit tussen 1 dag na shunt (T8) en 3 weken na shunt (T28), of wanneer de dieren tekenen van rechter ventrikel falen ontwikkelen (dit vindt echter meestal plaats tussen T28 en T35).

Dit model resulteert in een ziekte-fenotype dat sterk overeenkomt met de menselijke vorm van PAH-CHD. Voor dit model van hanteren wij ratten van 200-250 gram.



Controlemodellen op het flow-PAH model met ziekteontwikkeling, zijn 1) het MCT-only en 2) flow-only model, waarbij ofwel alleen 1) een MCT-injectie wordt gegeven, ofwel alleen 2) een aortocavale shunt wordt aangelegd. In het ziektevrije controlemodel krijgen de dieren een injectie met fysiologisch zout en een sham-operatie.

Afhankelijk van de vraagstelling kan het dier in verschillende fasen van ziekteprogressie geofferd worden. De ziekte-ernst (hemodynamisch, histomorfologisch) is reeds voor een aantal belangrijke tijdstippen in kaart gebracht (1 dag na shunt, 7 dagen na shunt, 21 dagen na shunt). Tijdens ziekteprogressie kunnen eventueel bloedmonsters genomen worden voor biomarker analyse. Dit zal gebeuren via orbita of staart.

Dit model kan ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten. Hiervoor zullen doorgaans twee groepen gebruikt worden (met en zonder behandeling). Afhankelijk van de medicatie kunnen verschillende toedieningsvormen worden gebruikt: oraal via voer of drinkwater; via osmotische mini-pomp, IP, IV, subcutane of intramusculaire injecties. Indien mogelijk zal de toediening gekozen worden waarbij het ongerief voor de dieren zo laag mogelijk is, maar waarbij de gekozen dosering wel met redelijke zekerheid gewaarborgd is.

#### NIEUWE TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Het model voor flow-PAH, of haar variaties en controles kan worden gebruikt voor een aantal nieuwe toepassingen, relevant voor het voorgestelde project.

1) Er is in ons lab een methode ontwikkeld om endotheelcellen te isoleren uit de rattenlongen op verschillende tijdstippen van de ziekte. PAH wordt hiertoe geïnduceerd en gekarakteriseerd zoals hierboven beschreven, waarna de rat wordt geofferd en de longen worden uitgenomen. De geïsoleerde endotheelcellen kunnen vervolgens worden gebruikt voor genotypering, het onderzoeken van signaleringspathways en het testen van farmacologische compounds.

2) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van bestaande PET tracers tbv de in vivo imaging van de ziekte.

3) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van nieuwe farmacologische behandelingsopties voor PAH. Medicatie kan op elk gewenst moment (preventief of bij gemanifesteerde ziekte) worden toegediend, via de hierboven beschreven toedieningswegen.

---

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Er is reeds veel data beschikbaar over het induceren van PAH en geassocieerd RVF in het bovengenoemde model. Op basis van onze primaire uitkomstmaten kunnen power-analyses berekend worden die het aantal benodigde dieren tot een minimum beperken. Bij een nieuwe therapeutische of diagnostische interventie zullen we de minimale groepsgroottes berekenen op basis van vergelijkbare onderzoeken in vergelijkbare modellen. Als deze onderzoeken niet voor handen zijn of teveel afwijken van ons beoogde model, zullen we een pilot-experiment uitvoeren om onze power-analyse te berekenen.

Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses. De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen daarnaast in retrospect worden gebruikt om te vergelijken met de resultaten van de uiteindelijke studies.

De verkregen cellen uit de endotheelisolatie kunnen worden doorgekweekt en gebruikt worden om een drugscreen (in vitro) te verrichten. Het meest geschikte farmacon kunnen we vervolgens testen in vivo.

Door niet-invasieve methoden als echografie en PET onder anesthesie te gebruiken, kunnen wij de ziekteprogressie over de tijd vervolgen. Derhalve hoeven deze dieren niet te worden geofferd op verschillende tijdpunten. Dit reduceert het aantal dieren.

Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor immunohistochemische analyses. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De experimentele groepen zullen worden vergeleken met behulp van ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt een alpha van 0.05 aangehouden en streven we een power na van >80%.

---

## **B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten: Ratten. Inbred (tbv model II PAH-LTx, bijlage 2) en outbred.

Herkomst: code B. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen. (Harlan, Horst, NL).

Levensstadium: De ratten zijn 7 à 8 weken bij start experiment, 12-14 weken bij opofferen. Het model is gevalideerd voor dit levensstadium.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Omdat de hemodynamische parameters, de rechter kamer functie en gewichten en de long en hart histologie de belangrijkste uitkomstparameters zijn, is vervanging door een cel- of computermodel niet mogelijk.

Vermindering/Verfijning: In ons lab bestaat ruime ervaring met het MCT-Flow-model in de rat. Groepsgroottes zijn gebaseerd op de verschillen in primaire uitkomstmaten tussen de experimentele groepen. Hierbij werden groepsgroottes van 4-8 ratten per groep aangehouden. Dit is ook gebruikelijk in modellen voor PAH in de wetenschappelijke literatuur in andere laboratoria. Er worden pilotstudies uitgevoerd ter beoordeling van de haalbaarheid van de experimenten en voor het berekenen van een poweranalyse. De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen. Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

In de celstudies uit lijn 1 (projectvoorstel) worden endotheelcellen van ratten met PAH doorgeweekt om farmacologische targets te testen. PAH moet wel worden opgewekt in een diemodel om de cellen te verkrijgen (geen vervanging), maar het doorkweken van de cellen geeft de mogelijkheid de therapiën eerst in vitro te testen, waarna alleen de meest potente farmaca daadwerkelijk in vivo zullen worden getoetst. Dit leidt tot een vermindering van het aantal



benodigde dieren.

Tijdens hun verblijf op het CDP worden de dieren 3 keer per week of vaker op indicatie gemonitord volgens het ABCD systeem, dat gehanteerd wordt door alle onderzoekers van de afdeling kindercardiologie. Hierbij wordt het dier in een standaard volgorde geëvalueerd op symptomen van hartfalen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

- De dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met verrijking. De dieren worden gehuisvest volgens de standaard huisvesting in het CDP Groningen.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het CDP Groningen.
- Er wordt narcose en kapbeademing toegepast rondom de echocardiografie en evt PET-scan waaruit de dieren weer ontwaken. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische metingen, (PET scan) en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

- [Redacted text]

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een

instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting / humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen longvaatweerstand.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van rechter hart falen. Bij ernstig RVF (lethargie, zichtbare dyspnoe) worden dieren geofferd.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Sommige dieren zullen eind-stadium PAH moeten bereiken om onze onderzoeksvragen te beantwoorden.



Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

10-15%

**K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

matig.

**Einde experiment**

**L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Histologie van het hart en de longen is een essentiële uitkomstmaat voor PAH en geassocieerd RHF. Tevens wordt dit materiaal (en bloed) gebruikt voor verder laboratoriumonderzoek om geassocieerde mechanismen te onderzoeken.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |                             |                |
|-----|--------------------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 10500                       |                |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen |                |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                  | Type dierproef |
|     |                                                  | 2                           | PAH-ITx        |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot neo-intimavorming en irreversibele obstructie van de long arteriolen. PAH in congenitale hartaandoeningen (CHD) kent echter ook een unieke, reversibele fase. PAH in CHD wordt veroorzaakt door een toegenomen pulmonale flow en druk: een gevolg van een systemisch-naar-pulmonale shunt die bestaat bij veel CHD. Tijdige correctie van de shunt (normalisering van de pulmonale hemodynamiek in een reversibel PAH stadium) kan ervoor zorgen dat de vaatafwijkingen bij PAH volledig genezen. Wordt de hartafwijking te laat gecorrigeerd (in een irreversibel PAH stadium), dan is genezing niet meer mogelijk en leidt correctie van de hartafwijking zelfs sneller tot de dood dan wanneer niet chirurgisch

wordt ingegrepen. 10% van alle kinderen met PAH-CHD wordt momenteel beoordeeld als irreversibel en worden derhalve niet geopereerd. 2-8% van de kinderen die wel worden geopereerd, ontwikkelen alsnog irreversibele PAH ondanks correctie van hun hartdefect. Het doel van dit deelproject is de mechanismen die bijdragen aan het ontstaan van irreversibiliteit (progressie) of reversibiliteit (herstel) beter te begrijpen. Dit kan leiden tot nieuwe methoden om een reversibel of irreversibel PAH stadium van elkaar te onderscheiden en tot nieuwe targets voor farmacologische interventie.

Samenvattend: Deze deelstudie onderzoekt het effect van hemodynamische normalisering op het fenotype van PAH in verschillende fasen van de ziekte. We brengen hiertoe een long met PAH (zeer vroeg, vroeg, gevorderd en eind-stadium) in een hemodynamisch normale situatie, door middel van long transplantatie. We hebben voor een longtransplantatiemodel (LTx) gekozen als methode van hemodynamische normalisering, omdat er in ons centrum veel ervaring is met het transplanteren van longen in de rat. Een soortgelijke methode van hemodynamische normalisering in Pulmonale Hypertensie is reeds succesvol uitgevoerd in (O'Blenc, J Thorac Cardiovasc Surg. 2001). Dit betrof echter een model met een significant verschillend ziektefenotype). De long histologie is in deze studie de belangrijkste uitkomstmaat. Het LTx model geeft hierin de unieke mogelijkheid zowel de baseline histologie in verschillende ziektefasen te karakteriseren in de niet te transplanteren (rechter) long, en dit af te zetten tegen de getransplanteerde (linker) long, na een periode van hemodynamische normalisering. Deze getransplanteerde (zieke) linker long kan vervolgens weer worden afgezet tegen de (niet zieke) rechterlong van de ontvanger. De specifieke procedure wordt hieronder verder uitgelegd.

Specifieke uitkomstmaten voor reversibiliteit zijn regressie van de vaatafwijkingen na LTx, kwantitatief uitgedrukt in verlaagde vasculaire occlusiescores, kwalitatief uitgedrukt in normaliseren van de vasculaire morfologie. Irreversibiliteit wordt primair gedefinieerd als status quo of progressie van de vaatafwijkingen na LTx.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Deze deel studie onderzoekt de reversibiliteit van vasculaire remodelering en geassocieerde mechanismen in de progressie van flow-PAH. We willen dit onderzoeken middels een longtransplantatie-(LTx-)model.

DONORRAT (induceren PAH):

T=0: Injectie monocrotaline (60mg/kg), eenmalig.

T=7: Aanleg aorto-cavale shunt, eenmalig. De shunt wordt gemaakt door met een 18G holle naald via de abdominale aorta een gat in de vena cava te prikken. Het gat in de aorta wordt vervolgens gedicht met weefselijm. Deze operatie duurt ca. 20 min en wordt geheel uitgevoerd onder inhalatieanesthesie. Het uitvalspercentage van de operatie is hooguit 10%.

T=7 tot maximaal T=28: Ziekteontwikkeling PAH. Per studiegroep wordt de linkerlong op verschillende momenten van ziekteprogressie (T=8, 14, 21 of 28) getransplanteerd in een gezonde ontvanger. De donorrat wordt hierna geofferd.

ONTVANGENDE RAT (LTx rat):

T=0: explantatie linkerlong, implantatie donorlong. De long wordt getransplanteerd volgens de standaard longtransplantatieprocedure die reeds meer dan 2000 keer is uitgevoerd in dit centrum. De procedure duurt in zijn geheel zo'n 4u en wordt geheel uitgevoerd onder inhalatieanaesthesie. Het uitvalspercentage van de operatie is hooguit 15%.  
T=7 tot maximaal T=28: periode van hemodynamische normalisering op de donor long. Per studiegroep wordt de rat op verschillende momenten geofferd (1 tot maximaal 4 weken na LTx).

Dit model kan ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten. Hiervoor zullen doorgaans twee groepen gebruikt worden (met en zonder behandeling). Afhankelijk van de medicatie kunnen verschillende toedieningsvormen worden gebruikt: oraal via voer of drinkwater; via osmotische mini-pomp, IP, IV, subcutane of intramusculaire injecties. Indien mogelijk zal de toediening gekozen worden waarbij het ongerief voor de dieren zo laag mogelijk is, maar waarbij de gekozen dosering wel met redelijke zekerheid gewaarborgd is.

---

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Er is reeds veel data beschikbaar over de primaire uitkomstmaten in flow-PAH, welke ook gelden in het huidige PAH-LTx model. Hierop kunnen power-analyses berekend worden die het aantal benodigde dieren tot een minimum beperken. Daarnaast wordt momenteel een pilot-experiment voorbereid om (onder andere) onze power-analyse te berekenen.

Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor immunohistochemische analyses. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De experimentele groepen zullen worden vergeleken met behulp van ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt een alpha van 0.05 aangehouden en streven we een power na van >80%.

---

## **B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten: Ratten. Inbred (ivm transplantatie).

Herkomst: code B. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen. (Harlan, Horst, NL).

Aantal: 450.

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED] We verwachten 3 [REDACTED] experimenten uit te voeren binnen de periode van 5 jaar. We houden momenteel rekening met een kans op uitval van maximaal 15%. Dit gaat in totaal dan om een geschat aantal van 525 dieren.

Levensstadium: De donorratten zijn 7 à 8 weken bij start experiment, 12-14 weken bij LTx. De ontvangers zijn tevens 10-12 weken bij LTx en 14-16 weken bij offeren.

---

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Omdat de hemodynamische parameters, de rechter kamer functie en gewichten en de long en hart histologie de belangrijkste uitkomstparameters zijn, is vervanging door een cel- of computermodel niet mogelijk.

Vermindering/Verfijning:

[REDACTED]. Op basis hiervan wordt de haalbaarheid beoordeeld en zullen de groepsgroottes worden berekend middels poweranalyse. De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen. Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

Tijdens hun verblijf op het CDP worden de dieren 3 keer per week of vaker op indicatie gemonitord volgens het ABCD systeem, dat gehanteerd wordt door alle onderzoekers van de afdeling kindercardiologie UMCG. Hierbij wordt het dier in een standaard volgorde geëvalueerd op symptomen van hartfalen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

- De dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met verrijking. De dieren worden gehuisvest volgens de standaard huisvesting in het CDP Groningen.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het CDP Groningen.
- Er wordt narcose en kapbeademing toegepast rondom de echocardiografie en evt PET-scan waaruit de dieren weer ontwaken. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen.
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische metingen en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

- Er zijn eerdere studies die PAH ratten longen transplanteren in een gezonde ontvanger (O'Blenes, 2001). Hierbij werd alleen gekeken naar effect van transplantatie in de vroege fase van de ziekte, in een single hit (monocrotaline-only) model voor PH, zonder de karakteristieke neo-intima lesions. In deze studie toetsen we reversibiliteit in een model met neointima lesions, een zogenaamd "double hit model" (MCT+Flow).

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting / humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.



☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie). Peroperatieve pijn.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen longvaatweerstand

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

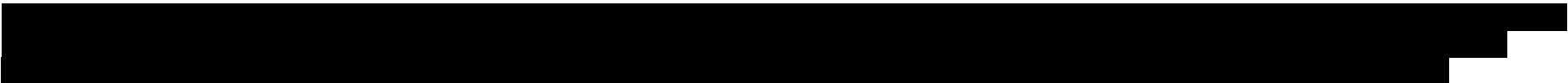
De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van rechter hart falen. Bij ernstig RVF (lethargie, zichtbare dyspnoe) worden dieren geofferd..

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- 
- De ontvangende dieren zijn gezond en ontvangen één long met variërende PAH stadia. Er zijn ratmodellen bekend waarbij ratten met slechts één long kunnen gedijen, zonder symptomen van dyspnoe. We verwachten niet dat de ontvangende dieren het humane eindpunt zullen halen. De ontvangende dieren zullen peroperatief gemonitord worden op complicaties van de LTx.
- De humane eindpunten zijn symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid en lethargie), welke gemonitord worden volgens het ABCD protocol. Eventuele post-operatieve complicaties van de longtransplantatie zullen zich ook uiten in deze 3 symptomen.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

10-15%

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

matig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Histologie van het hart en de longen is een essentiële uitkomstmaat voor PAH en geassocieerd RHF. Tevens wordt dit materiaal (en bloed) gebruikt voor verder laboratoriumonderzoek om geassocieerde mechanismen te onderzoeken.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

#### 1 Gegevens aanvrager

|     |                                                                                                                                                                           |                                                          |                                                            |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in  |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen |                                                            |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.                                                                                 | Naam instelling of organisatie                           |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde      |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | KvK-nummer                                               |                                                            |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer                                     |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Postbus                                                  |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Postcode en plaats                                       |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | IBAN                                                     |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Tenaamstelling van het rekeningnummer                    |                                                            |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.                                                                                                                  | (Titel) Naam en voorletters                              | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |                                                                                                                                                                           | Functie                                                  |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Afdeling                                                 |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Telefoonnummer                                           |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | E-mailadres                                              |                                                            |
| 1.5 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.                                                                               | (Titel) Naam en voorletters                              | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |                                                                                                                                                                           | Functie                                                  |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Afdeling                                                 |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Telefoonnummer                                           |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | E-mailadres                                              |                                                            |

- |     |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                 |            |                                                            |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------|
| 1.6 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning. | (Titel) Naam en voorletters                                                                                                                     | [Redacted] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |                                                                                                                                                                      | Functie                                                                                                                                         | [Redacted] |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                      | Afdeling                                                                                                                                        | [Redacted] |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                      | Telefoonnummer                                                                                                                                  | [Redacted] |                                                            |
|     |                                                                                                                                                                      | E-mailadres                                                                                                                                     | [Redacted] |                                                            |
| 1.7 | Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?                                                                                                                     | <input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i><br><input type="checkbox"/> Nee |            |                                                            |

## 2 Over uw aanvraag

- |                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>2.1 Wat voor aanvraag doet u?</p>                                                                          | <div> <input type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag &gt; Ga verder met vraag 3         </div> <div> <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn<br/>           Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2         </div> <div> <input type="checkbox"/> Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn<br/>           Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3         </div> |
| <p>2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?</p> | <div> <input type="checkbox"/> Ja &gt; Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier         </div> <div> <input type="checkbox"/> Nee &gt; Ga verder met vraag 3         </div>                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?</p>   | <div> <input type="checkbox"/> Nee &gt; Ga verder met vraag 3         </div> <div> <input type="checkbox"/> Ja &gt; Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6         </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

### 3 Over uw project

- |     |                                                                                                                                               |             |   |   |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---|---|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project?                                                                                       | Startdatum  | - | - |
|     |                                                                                                                                               | Einddatum   | - | - |
| 3.2 | Wat is de titel van het project?                                                                                                              |             |   |   |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?                                                                                          |             |   |   |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorleegt? | Naam DEC    |   |   |
|     |                                                                                                                                               | Postadres   |   |   |
|     |                                                                                                                                               | E-mailadres |   |   |

## 4 Betaalgegevens

|     |                                                      |                                                                                                      |
|-----|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4.1 | Om welk type aanvraag gaat het?                      | <input type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € <span style="float: right;">Lege</span> |
|     |                                                      | <input type="checkbox"/> Wijziging € <span style="float: right;">Lege</span>                         |
| 4.2 | Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. | <input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso                                                   |
|     |                                                      | <input type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur                                                 |

*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

|     |                              |                                                                                                                    |
|-----|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5.1 | Welke bijlagen stuurt u mee? | Verplicht<br><input type="checkbox"/> Projectvoorstel<br><input type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting     |
|     |                              | Overige bijlagen, indien van toepassing<br><input type="checkbox"/> Melding Machtiging<br><input type="checkbox"/> |

## 6 Ondertekening

|     |                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6.1 | Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:<br><br>Centrale Commissie<br>Dierproeven<br>Postbus 20401<br>2500 EK Den Haag | Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> <li>• dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.</li> <li>• dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.</li> <li>• dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.</li> <li>• dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.</li> <li>• dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.</li> </ul> |
|     |                                                                                                                                                                                                                        | Naam <span style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|     |                                                                                                                                                                                                                        | Functie <span style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|     |                                                                                                                                                                                                                        | Plaats <span style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|     |                                                                                                                                                                                                                        | Datum <span style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|     |                                                                                                                                                                                                                        | Handtekening <span style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

**Van:** [REDACTED]@umcg.nl>  
**Verzonden:** maandag 8 juni 2015 11:45  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag betreffend projectaanvraag RuG code 8007

Beste [REDACTED]

De specifieke vraag of beide geslachten voor het onderzoek bruikbaar zijn is niet ter sprake gekomen tijdens de vergadering.

Vr. gr.

[REDACTED]  
 Secretaris DEC

---

**From:** [REDACTED]  
**Sent:** maandag 8 juni 2015 11:19  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** vraag betreffend projectaanvraag RuG code 8007

Geachte meneer [REDACTED]

Betreffende projectaanvraag : 'pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie' met AVD nummer 105002015129, bij u bekend onder interne RuGcode8007, is door uw DEC advies uitgebracht aan de CCD. Wij willen een vraag aan de onderzoeker stellen over de dieren die gebruikt worden voor dit onderzoek. In de beschrijving dieproeven wordt alleen het gebruik van ratten beschreven, de CCD wil u vragen of in de vergadering van de DEC ter sprake is gekomen of het mogelijk zou zijn beide geslachten voor dit onderzoek te gebruiken.

Ik hoor graag van u, mocht u dit niet besproken zijn dan zullen wij de onderzoeker vragen deze beschrijving nader toe te lichten en indien nodig meer specifiek het gebruik van 1 geslacht toe te onderbouwen,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
**Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag**  
 .....

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. RVO.nl is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 8 juni 2015 14:05  
**Aan:** [REDACTED]@rug.nl'; [REDACTED]@umcg.nl'  
**Onderwerp:** aanvullende vragen AVD105002015129  
**Bijlagen:** aanhouden.beoordelen129.pdf

Geachte [REDACTED]

Wij hebben nog een paar vragen over uw projectaanvraag.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
**Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag**  
.....



[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 8 juli 2015 10:00  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Dierproef ontvangsten 7-7-2015  
**Categorieën:** [REDACTED]

EREF IBAN/NL45INGB0651575079BIC/INGBNL2ANAME/UMCG TAV FIN ADM HPC LB25/REMI/15700129EREF100-1248-327-113586 (741 euro)

Met vriendelijke Groet,

[REDACTED]  
Medewerker Financiële administratie

.....  
**Team Apparaatsadministratie**  
**Financien en Control**  
**Rijksdienst voor Ondernemend Nederland**  
.....

T [REDACTED]  
[REDACTED]@rvo.nl  
<http://www.rvo.nl>



## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. \_\_\_\_\_
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. University Medical Center Groningen - [REDACTED].
- 1.3 Vul de titel van het project in. Pathobiologie, Reversibiliteit, Imaging en Behandeling van Pulmonale arteriële hypertensie.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☒ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

---

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
  - Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
  - Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.
- 

#### AANLEIDING

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige, progressieve en irreversibele longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot progressieve obstructie van de long arteriolen. Het histologisch beeld van de vaatlaesies in PAH is inmiddels goed in kaart gebracht, maar het onderliggende mechanisme wordt nog onvoldoende begrepen.

PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een congenitale hartafwijking (PAH-CHD). Het is bekend dat correctie van deze hartafwijking in een vroeg (reversibel) stadium van de ziekte kan leiden tot volledig klinisch herstel en regressie van de vaatlaesies. Te late correctie, in een irreversibel stadium van de ziekte, kan echter leiden tot versnelde ziekteprogressie en de dood. Het is voor de keuze en timing van interventie in PAH-CHD daarom essentieel de progressie en het stadium van de ziekte goed in kaart te brengen. Huidige diagnostische technieken blijken echter nog onvoldoende betrouwbaar om het onderscheid te maken tussen reversibele en irreversibele PAH, en zijn bovendien invasief en belastend voor het (jonge) kind.

Wanneer PAH-CHD irreversibel is, is longtransplantatie (LTx) momenteel de enige mogelijkheid tot genezing. Huidige behandelstrategieën kunnen de ziekteprogressie slechts vertragen, maar niet volledig stoppen of omkeren. PAH-CHD is hiermee nog steeds een dodelijke ziekte die al op jonge leeftijd kan leiden tot rechter hart falen (RHF) en de dood.

Samengevat: Er is nog onvoldoende kennis over de mechanismen van (de progressie van) longvaatremodellering in PAH-CHD. We kunnen de ziekteprogressie bovendien nog niet betrouwbaar volgen in de individuele patiënt en weten niet wanneer de ziekte irreversibel is. De progressie van irreversibele PAH-CHD, evenals alle andere vormen van PAH, kan momenteel slechts beperkt worden vertraagd, en niet worden genezen.

#### ACHTERGROND

PAH uit zich meestal al op jonge leeftijd en de gemiddelde levensverwachting is momenteel 3-5 jaar. PAH kent verschillende oorzaken: erfelijk, medicatie/toxinegeïnduceerd of als complicatie van aangeboren hartafwijkingen (CHD) of infecties zoals HIV; soms blijft de oorzaak onbekend. Alle vormen van PAH worden gekenmerkt door eenzelfde patroon van progressieve en irreversibele vaatafwijkingen in de longarteriën, welke zorgen voor een stijging van de longvaatdruk en weerstand. Het klinisch probleem dat PAH momenteel geeft is tweeledig: Het primaire ziekteproces (vasculaire remodeling) kan 1) onvoldoende betrouwbaar worden beoordeeld en 2) slechts beperkt worden geremd. De sleutel in het oplossen van dit probleem ligt primair in het beter begrijpen van de mechanismen betrokken bij de progressie en reversibiliteit van vasculaire remodeling in PAH.

PAH-CHD, of flow-PAH is een ideale subklasse van PAH om ziekteprogressie en reversibiliteit te onderzoeken door 2 unieke eigenschappen:

---

- 1) PAH-CHD is de enige vorm waarbij we de pathogene trigger kennen en kunnen kwantificeren.
- 2) PAH-CHD is de enige vorm die een reversibele fase kent.

1) De vaatafwijkingen in PAH-CHD ontwikkelen als gevolg van een toegenomen of abnormale flow en druk in de pulmonale circulatie, die voorkomt bij veel aangeboren hartafwijkingen. Eerder in ons lab is in ratten aangetoond dat een toegenomen pulmonale flow leidt tot verdikking van de spierlaag (mediahypertrofie) om de longarteriën (vroeg stadium PAH). Bij ziekteprogressie zien we dat ook de endotheellaag (intima) gaat verdikken, waardoor het vat dichtgroeit (neo-intimalaësie, eind stadium PAH) [van Albada, Dickinson, resp. 2008, 2011].

De meest ingrijpende veranderingen op cellulair niveau vinden plaats in de endotheelcellen van deze (neo)intima. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

2) Ook een reversibele fase is vooralsnog uniek voor PAH-CHD. Het normaliseren van abnormale pulmonale hemodynamiek (de trigger), door het corrigeren van het hartdefect, kan in een vroeg, reversibel stadium PAH leiden tot regressie van de vaatafwijkingen en volledig klinisch herstel. Wanneer de correctie van het hartdefect plaatsvindt in het irreversibele stadium, zal de longvaatziekte desondanks voortschrijden. Deze laatste groep kinderen blijkt een nog slechtere prognose te hebben dan wanneer het hartdefect open gelaten wordt. Beter begrip van het effect van hemodynamische normalisering op de pulmonale vaatremodelering in verschillende ziektestadia kan helpen in het ontrafelen van de mechanismen die specifiek betrokken zijn bij reversibiliteit. Dit voorkomt dat kinderen met PAH-CHD onterecht niet of wel worden geopereerd. Tevens kan dit leiden tot nieuwe targets voor farmacologische interventie in PAH-CHD en mogelijk in alle overige vormen van PAH.

Essentieel voor de timing van deze farmacologische interventie (in PAH) of van hemodynamische normalisatie (in PAH-CHD), is dus een betrouwbare inschatting van het ziektestadium. De beoordeling hiervan wordt momenteel gemaakt op basis van een combinatie van klinische parameters en hemodynamische onderzoeken zoals echografie en rechter hart katheterisatie. Geen van deze technieken kan echter betrouwbare informatie geven over het primaire ziekteproces en haar reversibiliteit. PET-CT onderzoek zou een mogelijkheid kunnen bieden om vaatremodelering in vivo in beeld te brengen. De eerste studies met de conventionele 18F-FDG PET tracer in PAH zijn reeds gepubliceerd [marsboom, zhao, resp. 2011, 2014] en geven aanleiding tot het testen van nieuwe PET tracers, specifiek voor vasculaire remodelering.

#### VOORGAAND ONDERZOEK:

Er is reeds 10 jaar ervaring met diermodellen voor PAH-CHD op de afdeling CCH-UMCG [van Albada, Dickinson 2005-2014]. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] De klinische, hemodynamische en histologische progressie van flow-PAH is inmiddels goed in kaart gebracht. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] Vroeg stadium MCT/flow-PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door geïsoleerde mediahypertrofie en een slanke intimalaag met kenmerken van hyperproliferatie en verhoogde apoptose. Gevorderd stadium PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door mediahypertrofie en een verdikte (neo)intima laag, met kenmerken van apoptose-resistentie. Beide fasen zijn overeenkomstig met de humane PAH-CHD. Dit model (Ia) wordt nogmaals beschreven onder paragraaf 3.4.2.

#### Context

Centraal bij dit onderzoek staat het doel om de prognose en kwaliteit van leven van patiënten met PAH te verbeteren. [REDACTED]

[REDACTED]

Het UMCG heeft als missie iedereen gezond oud te laten worden, ondanks de aanwezigheid van chronische aandoeningen als PAH. Dit onderzoek is een belangrijk onderdeel van een landelijke onderzoek naar nieuwe therapieën voor PAH (PHAEDRA, een samenwerking van het UMCG met de VU (Prof. [REDACTED]), LUMC (Prof. [REDACTED]) en het Erasmus MC (Prof. [REDACTED])).

Recente, relevante Literatuur PAH algemeen:

Berger RM, Beghetti M, Humpl T, Raskob GE, Ivy DD, Jing ZC, et al. Clinical features of paediatric pulmonary hypertension: a registry study. *Lancet* 2012 Feb 11;379(9815):537-546.

Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 Aug 1;186(3):261-272.

Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010 Dec;43(6):629-634  
Manes A, Palazzini M, Leci E, Bacchi Reggiani ML, Branzi A, Galie N. Current era survival of patients with pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease: a comparison between clinical subgroups. *Eur Heart J* 2014 Mar;35(11):716-724.

Zhao L, Ashek A, Wang L, Fang W, Dabral S, Dubois O, et al. Heterogeneity in lung (18)FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic (18)FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodeling targeted treatments. *Circulation* 2013 Sep 10;128(11):1214-1224.

Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Pechoux C, Bogaard HJ, et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2015 Jan 15.

Literatuur diermodellen flow-PAH (UMCG):

van Albada ME, Schoemaker RG, Kemna MS, Cromme-Dijkhuis AH, van Veghel R, Berger RM. The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005 Sep;26(3):487-493.

Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, Berger RM. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013 Jul 1;305(1):L1-14.

Dickinson MG, Bartelds B, Molema G, Borgdorff MA, Boersma B, Takens J, et al. Egr-1 expression during neointimal development in flow-associated pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 2011 Nov;179(5):2199-2209.

Dickinson MG, Kowalski PS, Bartelds B, Borgdorff MA, van der Feen D, Sietsma H, et al. A Critical Role for Egr-1 during Vascular Remodelling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiovasc Res* 2014 Jul 14.

Literatuur diermodellen longtransplantatie (UMCG) (enkele recente voorbeelden)

Munneke AJ1, Rakhorst G, Petersen AH; Flush at room temperature followed by storage on ice creates the best lung graft preservation in rats. *Transpl Int*. 2013 Jul;26(7):751-60. doi: 10.1111/tri.12113.

Zweers N, Petersen AH. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation*. 2004 Nov 15;78(9):1251-8.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het doel van dit project is globaal in te delen in 3 hoofdpeilers:

1. Het ontrafelen van de pathobiologie van PAH, zowel op genetisch, moleculair, cellulair, histologisch niveau. [REDACTED]  
[REDACTED] Daarnaast zal ook de rol van geslacht op ziekteprogressie worden onderzocht.
2. Het karakteriseren van Reversibiliteit in PAH-CHD. Wat is het effect van normalisering van de pulmonale hemodynamiek op PAH longen; en tot welk tijdstip is de ziekte nog reversibel? Is er een point of no return? Wat zijn de mechanismen die hierbij een rol spelen?
3. Het ontdekken van nieuwe strategieën om de ziekte invasief en non-invasief te kunnen volgen en te stadiëren door het zoeken naar nieuwe biomarkers en toepassen van in vivo imaging technieken als PET-CT.
4. Farmacologische interventie op pathogene targets gevonden onder doel 1a en 1b, die kunnen leiden tot een nieuwe behandeling voor PAH.

AD 1. Om de pathobiologie van PAH te ontrafelen zijn we van plan endotheelcellen te isoleren uit het MCT/flow-ratmodel (model Ia, paragraaf 3.4.2.) in verschillende stadia van de ziekte. [REDACTED]  
[REDACTED]

Deze drugscreen wordt uitgevoerd in samenwerking met het LUMC. Het weefsel en bloed dat niet gebruikt wordt voor de endotheelcelisolatie, wordt gebruikt om de spatiotemporele expressie (histologie) of waarde als biomarker (bloed) van nieuwe targets te onderzoeken. [REDACTED]  
[REDACTED]

Om de rol van geslacht op ziekteprogressie in PAH te onderzoeken zullen we het MCT/flow-ratmodel (model Ia, paragraaf 3.4.2.) ook in vrouwelijke ratten toepassen.

AD 2. Om de reversibiliteit van flow-PAH te onderzoeken zijn we momenteel bezig een model te ontwikkelen voor hemodynamische normalisatie in verschillende stadia van de ziekte. (model II, paragraaf 3.4.2.). [REDACTED]

[REDACTED] Dit simuleert de situatie van het sluiten van een hartdefect bij kinderen met PAH-CHD, waarbij de ziekte soms regressief en soms progressief is. Dit ratmodel geeft ons de mogelijkheid te bepalen (primair op long histologisch niveau) in welk stadium de ziekte nog reversibel is, en welke mechanismen betrokken zijn bij regressieve, dan wel progressieve ziekte. [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

AD 3. We hebben als doel het primaire remodeleringsproces in de longvaten bij ratten met verschillende stadia van PAH minimaal invasief en in vivo in beeld te brengen. We zullen hiertoe minimaal 2 PET-tracers testen in het bekende MCT/Flow ratmodel. (model Ia en Ib, paragraaf 3.4.2.) We testen al bestaande tracers die hun oorsprong hebben in de oncologie en in PAH een nieuwe toepassing zouden kunnen vinden. [REDACTED]  
[REDACTED]

Het bloed dat gestandaardiseerd verzameld wordt in alle dierproeven in de context van PAH zal gebruikt worden om nieuwe bloed biomarkers te vinden die in relatie staan tot de functionele en structurele veranderingen in het pulmonale vaatbed, of het collateraal aangedane rechter ventrikel.

AD 4. De studies uit doel 1 en de nationale samenwerkingen binnen het PHAEDRA consortium hebben als doel nieuwe targets te vinden voor de behandeling van PAH. Er wordt momenteel een grootschalige drugscreen uitgevoerd om te evalueren of al bestaande farmaca toegepast zouden kunnen worden in de behandeling PAH. [REDACTED]. We hebben hier als doel het gekozen farmacon in vivo te testen in het MCT/flow ratmodel (model Ia en b), zowel preventief als bij gemanifesteerde ziekte. Tevens beogen wij het farmacon te

testen in het transplantatiemodel (model II) beschreven onder doel 1b (als add-on therapie naast hemodynamische normalisatie). Er is binnen onze onderzoeksgroep reeds ervaring met het geven van therapie in ratmodellen voor PAH via verschillende toedieningwijzen (Dickinson 2011, 2014).

Voor de uitvoering van deze doelen zijn de volgende specifieke elementen nodig:

1. Een ratmodel voor PAH ontwikkeling als gevolg van een verhoogde pulmonale flow. Een model voor flow-PAH is reeds geoptimaliseerd in de wistar rat, gestandaardiseerd en gekarakteriseerd per ziektefase. [van Albada: Eur resp J 2005, Dickinson: Am J Pathol 2011, Circ res 2014] (model I paragraaf 3.4.2.). In dit model kunnen pathobiologische mechanismen worden onderzocht, kunnen PET-tracers worden getest en kan farmacologische interventie worden toegepast. (model Ia)
2. Een methode om endotheelcellen te isoleren uit rattenlongen met verschillende PAH stadia. Deze methode is reeds geoptimaliseerd.
3. Een methode om tracers te testen in ratten. Het UMCG beschikt over een geavanceerd micro-PET centrum en veel ervaring in de uitvoering van studies met radioactieve tracers in proefdieren.
4. Een ratmodel voor flow-PAH, geschikt voor de transplantatiestudies (doel 1b). Het MCT/Flow model is reeds gekarakteriseerd in de Lewis rat: een inbred rat welke, in tegenstelling tot de Wistar rat, gebruikt kan worden voor transplantatie. (model Ib onder paragraaf 3.4.2.)
5. Een ratmodel voor flow-PAH reversibiliteit. (model II, paragraaf 3.4.2.). Hierbij wordt een PAH-long, (PAH opgewekt in model Ib (element 4)), getransplanteerd in een gezonde ontvanger. [REDACTED]

[REDACTED] In dit model kunnen pathobiologische mechanismen specifiek voor reversibiliteit worden onderzocht, kunnen PET-tracers worden getest en kan farmacologische interventie worden toegepast.

[REDACTED] We kunnen hartfunctie o.a. onderzoeken d.m.v. elektrocardiogram (ECGs), echocardiografie (ECHO), rechter hartcatheterisatie (R-CATH). Daarnaast hebben we een breed scala aan (immuno)histochemische en moleculaire technieken tot onze beschikking om veranderingen tot in alle details te onderzoeken. Voor het uitvoeren van deze specialistische ingrepen hebben we een zeer ervaren biotechnicus op onze afdeling en het centraal dierproef laboratorium (CDL) heeft een microchirurgisch team dat ons hier ook in bijstaat.

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Dit onderzoek vormt een belangrijk onderdeel van de PHAEDRA trial, dat zich erop richt de toekomst van (jonge) kinderen en volwassenen met PAH te verbeteren, zowel wat betreft de levensduur als de kwaliteit van leven. PAH is een ziekte die zeldzaam is (2,3 per 1.000.000), maar een 5-jaarsoverleving heeft van <50%. Huidige behandelstrategieën kunnen het ziekteproces slechts remmen maar niet genezen. Onnauwkeurige stadiëring (inschatting van reversibiliteit) van het ziekteproces leidt in 2-8% van de patiënten met PAH-CHD tot onterechte sluiting van het hartdefect en daarmee tot een belangrijke verkorting van de prognose van het kind.

De resultaten die voortkomen uit dit project zullen bijdragen aan:

- 1) Kennis van het mechanisme ziekteontwikkeling en progressie in PAH.
- 2) Nauwkeuriger diagnose en stadiëring bij patiënten met PAH, zodat behandeling beter kan worden gekozen en getimed.
- 3) Behandelstrategieën om PAH te voorkomen en te genezen.

Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek is ook gedetailleerd getoetst door (veelal internationale) reviewers bij het aanvragen van

\_\_\_\_\_

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Er bestaat reeds een rat-model voor flow-PAH [REDACTED] in ons lab.

Uit het bloed of weefsel van deze diersmodellen kunnen we cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfologische mechanismen te karakteriseren.

Op deze modellen kunnen we diagnostische interventies toepassen, zoals bloedtesten, echografie, telemetrie, PET-CT, en hartcatheterisatie.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Onderzoeksstrategie.

Om de doelen zoals beschreven in paragraaf 3.2 te bereiken, zetten wij de volgende lijnen uit binnen dit project. De verschillende lijnen hangen sterk met elkaar samen.

1. Vasculaire celstudies: cellen geïsoleerd uit dieren met verschillende stadia van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia (flow-PAH in de wistar rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD) om de cellen uit te oogsten. De cellen kunnen we doorkweken om 1) gen- en eiwitexpressie te karakteriseren [REDACTED] en 2) farmacologische compounds te testen, die specifiek aangrijpen op het veranderde fenotype dat de endotheelcel heeft verkregen tijdens ziekteprogressie. Deze drugscreen wordt uitgevoerd in samenwerking met het LUMC. Hieruit zullen een aantal potentiële farmaca volgen, waarvan de beste in vivo getest zullen worden in lijn 5.

2. Pathobiologiestudies. Onttrafen van de mechanismen of factoren die ten grondslag liggen aan het ontstaan en de progressie van PAH. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia/b (flow-PAH in wistar en/of lewis rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD). Het weefsel en bloed van de ratten wordt gebruikt om de spatiotemporele expressie (histologie) of waarde als biomarker (bloed) van nieuwe targets te onderzoeken. Dit continueert reeds 10 jaar lopend onderzoek naar de pathobiologie van PAH in ons lab. Op basis van deze lijn zal tevens worden bepaald welke PET-tracers in lijn 4 gebruikt zullen worden. De aangrijppunten van de potentiële tracers zullen voorafgaand aan de experimenten in lijn 4 histologisch worden gevalideerd in het longweefsel uit deze lijn.

3. Reversibiliteitsstudies. Het karakteriseren van de (ir)reversibiliteit van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model II [REDACTED], een model voor het beloop van PAH-CHD na sluiten van de cardiale shunt). Verschillende stadia van PAH worden geïnduceerd in de ratten. [REDACTED]

De zieke longen komen zo in een hemodynamisch genormaliseerde omgeving. Dit model bootst sluiting van de cardiale shunt na bij kinderen met PAH en een congenitale hartafwijking. Dit ratmodel geeft ons de mogelijkheid te bepalen (primair op long histologisch niveau) in welk stadium de ziekte nog reversibel is, en welke mechanismen betrokken zijn bij regressieve, dan wel progressieve ziekte. De targets die specifiek geassocieerd zijn met regressieve / progressieve ziekte kunnen dienen als biomarker of als aangrijppunt voor



farmacologische interventie, welke prospectief kunnen worden getoetst in lijn 5.

4. Imagingstudies. Imaging en stadiëring van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de ziekte een PET-CT scan krijgen. We testen al bestaande tracers die hun oorsprong hebben in de oncologie en in PAH een nieuwe toepassing zouden kunnen vinden.

5. Interventiestudies. Interventie op targets die gevonden worden in de Celstudies, Pathobiologiestudies en Reversibiliteitsstudies.

De interventiestudies kunnen worden getest in model I en II).

AD1 en 2) Er wordt reeds 10 jaar onderzoek gedaan naar de pathobiologie van PAH in model Ia (flow-PAH). Uit het bloed of weefsel van deze diervormen kunnen we (endotheel)cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfologische mechanismen te karakteriseren. Ook zal de rol van geslacht worden onderzocht door model Ia (flow-PAH) ook in vrouwelijke ratten toe te passen.

AD4) Op deze modellen kunnen we ook diagnostische interventies toepassen. Diagnostische interventies die reeds geprotocolleerd zijn, zijn elektrocardiogram (ECGs), echocardiografie (ECHO), rechter hartcatheterisatie (R-CATH). Dit is ondersteunende diagnostiek. Ook nieuwe diagnostische technieken, zoals PET-CT kunnen worden toegepast in deze modellen.

AD5) Op deze modellen kunnen we vervolgens ook therapeutische interventies toepassen. De targets voor interventie worden gevonden in de studies naar pathobiologie en reversibiliteit die zowel in dit onderzoek als in het onderzoeksconsortium PHAEDRA gevonden worden.

De medicatie kan in beide modellen gegeven worden

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Samenhang tussen onderzoekslijnen (zie 3.4.2):

In lijn 1 wordt de ziekte op celniveau bestudeerd en kan gezocht worden naar targets voor interventie. Deze targets kunnen met specifieke farmaca gestimuleerd of geremd worden. Dezelfde targets worden daarna bestudeerd op histologisch niveau in lijn 2, Hierin worden tevens klinische, hemodynamische en histologische progressie van PAH en RHF gekarakteriseerd en gestadieerd. Deze karakterisatie is onder andere nodig voor de correlatie van de gegevens uit de imagingstudies, lijn 4. In de Reversibiliteitsstudies, lijn 3, wordt vervolgens het effect van normalisering van de hemodynamiek op de longvaatziekte bestudeerd, of het effect van longtransplantatie op het hart. In de interventiestudies, lijn5, wordt gebruik gemaakt van de targets gevonden in de cel- en pathobiologie en reversibiliteitsstudies. [REDACTED]

#### Fasering:

De eerste experimenten worden uitgevoerd onder Lijn 1 en 2. [REDACTED]

[REDACTED]. De gevonden eitwit/genexpressiepatronen uit lijn 1 kunnen vervolgens specifiek op histologisch niveau worden gevalideerd in de vaatlaesies van longen met PAH (lijn 2).

De gegevens uit lijn 1 en 2 vormen de basis voor experimenten uit lijn 3 en 4. [REDACTED]

Lijn 1,2 en 3 leveren targets op voor farmacologische interventie en vormen hiermee de basis voor lijn 5. Bovendien kan het effect van medicatie in de proeven uit lijn 5, evt in vivo gevolgd worden door gebruik te maken van de resultaten uit lijn 4.

#### Go/No-Go:

##### Algemeen:

Binnen het PHAEDRA consortium, waarin dit onderzoek wordt uitgevoerd, worden alle lopende onderzoekslijnen eens per kwartaal geëvalueerd. Hierbij zullen ook tijdens lopende projecten (naar aanleiding van eventuele problemen of vertraging in wetenschappelijke progressie) Go/No-go punten geformuleerd worden.

- Lijn 1+2) De onderzoeksmethode en procedures uit lijn 1 en 2 zijn reeds gevalideerd en lopend. In deze lijn worden geen belemmeringen voor de progressie van het onderzoek verwacht.

- Lijn 3) Voor de reversibiliteitsstudies uit lijn 3 wordt momenteel een pilot uitgevoerd om o.a. de haalbaarheid van de procedures te toetsen. [REDACTED]

- Lijn 4) Ook voor de imagingstudies in lijn 4 wordt momenteel een pilot uitgevoerd, om de technische haalbaarheid en het onderscheidend vermogen van PET-CT in flow-PAH te toetsen. [REDACTED]

[REDACTED] Dit zal per tracer overlegd worden binnen het PHAEDRA consortium en met de afdeling nucleair geneeskundige beeldvormende technieken van het UMCG.

- Lijn 5) De potentie van de te kiezen farmacologische interventie wordt eerst getoetst in celstudies. Hierna zal deze in de diermodellen I en II worden

toegepast. Een No-Go punt zou hierbij kunnen zijn: disproportioneel lijden als gevolg van een onverwachte bijwerking van het farmacon. Tevens is het mogelijk (althans tegen de verwachting in) dat er geen geschikt farmacon gevonden wordt in de drugscreen (lijn1). [REDACTED]  
[REDACTED] Bij onvoldoende verwachte potentie van een farmacon zal deze lijn vervallen. Het vinden en evalueren van een geschikt farmacon voor de behandeling van PAH is een hoofddoel van het PHAEDRA consortium. De overwegingen voor het kiezen en evalueren van een geschikt farmacon zullen binnen het consortium uitgebreid worden besproken.

---

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------|
| 1          | ■■■■■          |
| 2          | ■■■■■          |
| 3          |                |
| 5          |                |
| 6          |                |
| 7          |                |
| 8          |                |
| 9          |                |
| 10         |                |



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |                                                                                                                 |                |
|-----|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           |                                                                                                                 |                |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | University Medical Center Groningen - Center for Congenital Heart Diseases, Department of Pediatric Cardiology. |                |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                                                                                                      | Type dierproef |
|     |                                                  | 1                                                                                                               | Flow-PAH.      |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot neo-intimavorming en irreversibele obstructie van de long arteriolen. Dit zorgt voor een chronisch verhoogde pulmonale vaatweerstand, wat leidt tot rechter hart falen (RHF) en uiteindelijk de dood. PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een aangeboren cardiale systemisch-pulmonale shunt (PAH-CHD). Bij deze kinderen wordt aangenomen dat de toegenomen pulmonale flow en druk -een gevolg van de shunt- een essentiële trigger is voor het ontwikkelen van PAH. Eerder in ons lab is aangetoond dat toegenomen long-arteriële flow en druk ook bij ratten leidt tot de vaatafwijkingen en het geassocieerde rechter ventrikel falen, die de humane vorm van PAH



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |                                                                                                                 |                |
|-----|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           |                                                                                                                 |                |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | University Medical Center Groningen - Center for Congenital Heart Diseases, Department of Pediatric Cardiology. |                |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                                                                                                      | Type dierproef |
|     |                                                  | 1                                                                                                               | Flow-PAH.      |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot neo-intimavorming en irreversibele obstructie van de long arteriolen. Dit zorgt voor een chronisch verhoogde pulmonale vaatweerstand, wat leidt tot rechter hart falen (RHF) en uiteindelijk de dood. PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een aangeboren cardiale systemisch-pulmonale shunt (PAH-CHD). Bij deze kinderen wordt aangenomen dat de toegenomen pulmonale flow en druk -een gevolg van de shunt- een essentiële trigger is voor het ontwikkelen van PAH. Eerder in ons lab is aangetoond dat toegenomen long-arteriële flow en druk ook bij ratten leidt tot de vaatafwijkingen en het geassocieerde rechter ventrikel falen, die de humane vorm van PAH

karacteriseren.

Primaire, reeds gevalideerde uitkomstmaten in dit model:

De ziekteprogressie van PAH kan in vivo gemeten worden door middel van echocardiografie, telemetrie en/of hartcatheterisatie. Ziekte-ernst kan ex vivo worden gemeten op basis van de pulmonale vasculaire longmorfologie en pathologische kenmerken van rechter hartfalen. Deze uitkomstmaten zijn hieronder verder gespecificeerd.

1. Klinische tekenen van rechter kamer dysfunctie, zich uitend in verminderde inspanningstolerantie en veranderingen in activiteit, lichaamsgewicht, perifere circulatie, cyanose, dys- tachypnoe, oedeem en effusie.

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

2. Parameters voor pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie, gemeten m.b.v. echocardiografie en rechter hartcatheterisatie.

Echocardiografische parameters waarmee we de pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie kunnen bepalen zijn o.a.: Pulmonale acceleratietijd, pulmonale vasculaire weerstand, RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies). Voor deze parameters zijn eerder waarden bepaald in rat (Dickinson, Borgdorff 2011-2015, Urashima 2008 e.v.a.).

Rechter hartcatheterisatie wordt gebruikt om de bloeddruk te bepalen in het rechter atrium, rechter ventrikel, de pulmonaal arterie (arteriële pulmonale druk), en de wiggedruk (veneuze pulmonale druk). Daarnaast kunnen druk-volume relaties worden bepaald. Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met (verdenking op) PAH. Tevens kan telemetrie gebruikt worden om rechtsdruk continu te meten, wat tevens een maat is voor PAH.

3. Pulmonale vasculaire morfologie (ex vivo). De histomorfologie van de longarteriën is de gouden standaard in de evaluatie van PAH. Specifiek wordt gekeken naar het soort vasculaire laesie (media hypertrofie, neo-intimalaësie), wand-lumen ratio en occlusiescore. De histomorfologie in verschillende fasen en soorten van PAH is reeds in ons lab gekarakteriseerd (van Albada, van Loon, Dickinson 2005-2014).

4. Maten voor RV-falen (ex vivo). Dit zijn parameters voor rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht (fulton ratio), en/of b) lichaamsgewicht; en parameters voor rechter ventrikel falen: lever-oedeem, gemeten als wet-dry ratio van de onderste leverlobe.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

REEDS GESTANDAARDISEERDE BEHANDELING VAN DE DIEREN EN TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Flow-PAH in de rat.

Aard en frequentie van de behandeling: 1 malige injectie met monocrotaline (MCT), gevolgd door een 1 malige chirurgische aanleg van een aorto-cavale shunt.

Dit model resulteert in een ziekte-fenotype dat sterk overeenkomt met de menselijke vorm van PAH-CHD. Voor dit model van hanteren wij ratten van 200-250 gram.

Controlemodellen op het flow-PAH model met ziekteontwikkeling, zijn 1) het MCT-only en 2) flow-only model, waarbij ofwel alleen 1) een MCT-injectie wordt gegeven, ofwel alleen 2) een aortocavale shunt wordt aangelegd. In het ziektevrije controlemodel krijgen de dieren een injectie met fysiologisch zout en een sham-operatie.

Afhankelijk van de vraagstelling kan het dier in verschillende fasen van ziekteprogressie geofferd worden. De ziekte-ernst (hemodynamisch, histomorfologisch) is reeds voor een aantal belangrijke tijdstippen in kaart gebracht (1 dag na shunt, 7 dagen na shunt, 21 dagen na shunt). Tijdens ziekteprogressie kunnen eventueel bloedmonsters genomen worden voor biomarker analyse.

Dit model kan ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten. Hiervoor zullen doorgaans twee groepen gebruikt worden (met en zonder behandeling). Afhankelijk van de medicatie kunnen verschillende toedieningsvormen worden gebruikt: oraal via voer of drinkwater; via osmotische mini-pomp, IP, IV, subcutane of intramusculaire injecties. Indien mogelijk zal de toediening gekozen worden waarbij het ongerief voor de dieren zo laag mogelijk is, maar waarbij de gekozen dosering wel met redelijke zekerheid gewaarborgd is.

#### NIEUWE TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Het model voor flow-PAH, of haar variaties en controles kan worden gebruikt voor een aantal nieuwe toepassingen, relevant voor het voorgestelde project.

1) Er is in ons lab een methode ontwikkeld om endotheelcellen te isoleren uit de rattenlongen op verschillende tijdstippen van de ziekte. PAH wordt hiertoe geïnduceerd en gekarakteriseerd zoals hierboven beschreven, waarna de rat wordt geofferd en de longen worden uitgenomen. De geïsoleerde endotheelcellen kunnen vervolgens worden gebruikt voor genotypering, het onderzoeken van signaleringspathways en het testen van farmacologische compounds.



2) Karakteriseren van de rol van geslacht op de progressie van PAH. We kunnen het ratmodel voor flow-PAH ook toepassen op vrouwelijke ratten om zo het effect van geslacht(hormonen) op de ziekteprogressie van PAH te onderzoeken. PAH wordt op eenzelfde manier geïnduceerd en vergeleken met de ziekteprogressie in mannelijke ratten volgens de hierboven beschreven eindpunten.

3) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van bestaande PET tracers tbv de in vivo imaging van de ziekte.

4) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van nieuwe farmacologische behandelingsopties voor PAH. Medicatie kan op elk gewenst moment (preventief of bij gemanifesteerde ziekte) worden toegediend, via de hierboven beschreven toedieningswegen.

---

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Er is reeds veel data beschikbaar over het induceren van PAH en geassocieerd RVF in het bovengenoemde model. Op basis van onze primaire uitkomstmaten kunnen power-analyses berekend worden die het aantal benodigde dieren tot een minimum beperken. Bij een nieuwe therapeutische of diagnostische interventie zullen we de minimale groepsgroottes berekenen op basis van vergelijkbare onderzoeken in vergelijkbare modellen. Als deze onderzoeken niet voor handen zijn of teveel afwijken van ons beoogde model, zullen we een pilot-experiment uitvoeren om onze power-analyse te berekenen.

Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses. De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen daarnaast in retrospect worden gebruikt om te vergelijken met de resultaten van de uiteindelijke studies.

De verkregen cellen uit de endotheelisolatie kunnen worden doorgekweekt en gebruikt worden om een drugscreen (in vitro) te verrichten. Het meest geschikte farmacon kunnen we vervolgens testen in vivo.

Door niet-invasieve methoden als echografie en PET onder anesthesie te gebruiken, kunnen wij de ziekteprogressie over de tijd vervolgen. Derhalve hoeven deze dieren niet te worden geofferd op verschillende tijdpunten. Dit reduceert het aantal dieren.

Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor immunohistochemische analyses. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De experimentele groepen zullen worden vergeleken met behulp van ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt een alpha van 0.05 aangehouden en streven we een power na van >80%.

---

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten: Ratten. Inbred (tbv model II PAH-LTx, bijlage 2) en outbred.

Herkomst: code B. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen. (Harlan, Horst, NL).

Levensstadium: De ratten zijn 7 à 8 weken bij start experiment, 12-14 weken bij opofferen. Het model is gevalideerd voor dit levensstadium.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Omdat de hemodynamische parameters, de rechter kamer functie en gewichten en de long en hart histologie de belangrijkste uitkomstparameters zijn, is vervanging door een cel- of computermodel niet mogelijk.

Vermindering/Verfijning: In ons lab bestaat ruime ervaring met het MCT-Flow-model in de rat. Groepsgroottes zijn gebaseerd op de verschillen in primaire uitkomstmaten tussen de experimentele groepen. Hierbij werden groepsgroottes van 4-8 ratten per groep aangehouden. Dit is ook gebruikelijk in modellen voor PAH in de wetenschappelijke literatuur in andere laboratoria. Er worden pilotstudies uitgevoerd ter beoordeling van de haalbaarheid van de experimenten en voor het berekenen van een poweranalyse. De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen. Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

In de celstudies uit lijn 1 (projectvoorstel) worden endotheelcellen van ratten met PAH doorgekweekt om farmacologische targets te testen. PAH moet wel

worden opgewekt in een diemodel om de cellen te verkrijgen (geen vervanging), maar het doorkweken van de cellen geeft de mogelijkheid de therapiën eerst in vitro te testen, waarna alleen de meest potente farmaca daadwerkelijk in vivo zullen worden getoetst. Dit leidt tot een vermindering van het aantal benodigde dieren.

Tijdens hun verblijf op het CDP worden de dieren 3 keer per week of vaker op indicatie gemonitord volgens het ABCD systeem, dat gehanteerd wordt door alle onderzoekers van de afdeling kindercardiologie. Hierbij wordt het dier in een standaard volgorde geëvalueerd op symptomen van hartfalen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

- De dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met verrijking. De dieren worden gehuisvest volgens de standaard huisvesting in het CDP Groningen.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het CDP Groningen.
- Er wordt narcose en kapbeademing toegepast rondom de echocardiografie en evt PET-scan waaruit de dieren weer ontwaken. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische metingen, (PET scan) en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

- [REDACTED]

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting / humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen longvaatweerstand.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van rechter hart falen. Bij ernstig RVF (lethargie, zichtbare dyspnoe) worden dieren geofferd.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Sommige dieren zullen eind-stadium PAH moeten bereiken om onze onderzoeksvragen te beantwoorden.

. Het merendeel van de experimenten (>90%) zullen we uitvoeren met dieren die op of vóór dag 28 geofferd zullen worden. Meer dan de helft van deze dieren zal bovendien al voor dag 14 geofferd worden (vroeg-stadium PAH). De humane eindpunten zijn symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie), welke gemonitord worden volgens het ABCD protocol.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

10-15%

#### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

matig.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Histologie van het hart en de longen is een essentiële uitkomstmaat voor PAH en geassocieerd RHF. Tevens wordt dit materiaal (en bloed) gebruikt voor verder laboratoriumonderzoek om geassocieerde mechanismen te onderzoeken.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

DEB 11 | 15700129

auto 25/6/2015 en op 7/7/2015  
bank 56999666



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]  
A. Deusinglaan 1  
HPC:FA 29  
9713 AV Groningen  
Rijksuniversiteit Groningen

GBR 80000

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

## Factuur

Factuurdatum 08 juni 2015  
Vervaldatum 08 juli 2015  
Factuurnummer 15700129  
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

### Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven  
Betreft aanvraag AVD105002015129

### Bedrag

€ 741,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 8 juli 2015 10:00  
**Aan:** ZBO-CCD; [REDACTED]  
**Onderwerp:** Dierproef ontvangsten 7-7-2015

EREF IBAN/NL45INGB0651575079BIC/INGBNL2ANAME/UMCG TAV FIN ADM HPC LB25/REMI/15700129EREF100-1248-327-113586 (741 euro)

Met vriendelijke Groet,

[REDACTED]  
Medewerker Financiële administratie

.....  
**Team Apparaatsadministratie**  
**Financien en Control**  
**Rijksdienst voor Ondernemend Nederland**  
.....

T [REDACTED]  
[REDACTED]  
<http://www.rvo.nl>

2x ontvangen  
per 25/6 ook  
15700129

2x ontvangen oke op 7/7/2015

| IBAN               | Rekeningcode | Munt | Bedrag | Valutadatum | Boekdatum en -tijd | Transactiesoort | Klantreferentie  | Omschrijving                                                                                                                                                       |
|--------------------|--------------|------|--------|-------------|--------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NL28RBO50569996066 | EZ_RVO 6066  | EUR  | 741    | 06-30-15    | 06-30-15           | 654             | 170-811-47-41009 | /IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C<br>ENTRUM GRONINGEN/REMI/201570134/EREF/170-811-47-41009                                         |
| NL28RBO50569996066 | EZ_RVO 6066  | EUR  | 741    | 06-29-15    | 06-29-15           | 654             | 620946032        | /IBAN/NL72RABO0183605888/BIC/RABONL2U/NAME/BIOXPRT B.V./REMI/FACTUUR NR 201570121 AANVRAAG NR AVD90500201512<br>//ADDR/NISTELROOISE BAAN 3 5374RE SCHAUK NEDERLAND |
| NL28RBO50569996066 | EZ_RVO 6066  | EUR  | 741    | 06-25-15    | 06-25-15           | 654             | 170-807-1-41009  | /IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C<br>ENTRUM GRONINGEN/REMI/201570128/EREF/170-807-1-41009                                          |
| NL28RBO50569996066 | EZ_RVO 6066  | EUR  | 741    | 06-25-15    | 06-25-15           | 654             | 170-807-67-41009 | /IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C<br>ENTRUM GRONINGEN/REMI/15700129/EREF/170-807-67-41009                                          |
| NL28RBO50569996066 | EZ_RVO 6066  | EUR  | 741    | 06-25-15    | 06-25-15           | 654             | 170-807-68-41009 | /IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C<br>ENTRUM GRONINGEN/REMI/201570130/EREF/170-807-68-41009                                         |

201570134

201570121

201570128

201570129

201570130



**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** maandag 15 juni 2015 16:08  
**Aan:** [REDACTED]@rug.nl'  
**CC:** [REDACTED]@umcg.nl'  
**Onderwerp:** gewijzigd aanvraagnummer AVD105002015129

Geachte [REDACTED]

In het automatische systeem van de CCD is door een technische storing uw aanvraag nummer AVD105002015129 getiteld: " pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" vervangen voor aanvraagnummer AVD105002015145. U heeft dan ook per abuis nogmaals een ontvangstbevestiging en factuur ontvangen, deze kunt u als niet verzonden beschouwen. Wij houden uw aanvraag onder nummer AVD105002015129 in behandeling,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

Geachte CCD,

Groningen, 9-06-2015

*Betreft:*

*Respons aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven 8-6-2015*

Vraag 1. Looptijd project.

De looptijd van het project is van 01-08-2015 tot 01-08-2020. Dit is inderdaad foutief ingevuld op het formulier administratieve gegevens en is aangepast. Voor de uitvoering van de dierproeven in het voorgestelde project, met name de fasering in acht nemend, denken wij zeker 5 jaar nodig te hebben.

Vraag 2. Gebruik beide geslachten in dierproeven.

Uit de klinische studies uitgevoerd bij mensen met pulmonale arteriële hypertensie (PAH) blijkt dat er aanzienlijke verschillen zitten in ziekteontwikkeling tussen vrouwen en mannen. Vrouwen hebben een grotere kans om PAH te ontwikkelen; mannen overlijden sneller bij reeds gemanifesteerde PAH. De rol van geslachtshormonen is nog onduidelijk maar wordt momenteel geëxploreerd. Zie hiervoor bijvoorbeeld onderstaande review (1). Hierdoor hebben we tot nog toe alleen mannelijke ratten gebruikt voor onze experimenten en zullen de toekomstige experimenten ook met mannelijke ratten worden uitgevoerd.

De rol van geslacht op de progressie van PAH is geen primair onderzoeksdoel van deze aanvraag. Het is echter goed mogelijk en naar onze mening zowel wetenschappelijk gezien van belang als maatschappelijk van nut wegens het door u aangedragen argument, om in onze experimenten ook vrouwelijke ratten te includeren. We hebben dit besproken en besloten vrouwelijke ratten te includeren in een pilot studie om de rol van geslacht op ziekteprogressie te karakteriseren. Wanneer er geen significant effect van geslacht op de ziekteontwikkeling is, zal overwogen worden de overige experimenten onder bijlage 1 ook in vrouwelijke ratten uit te voeren.

Ik heb dit aangepast in de projectaanvraag dierproeven (onder 3.2: doel 1/AD 1; 3.4.2 onderzoeksstrategie) en bijlage 1 (onder A: experimentele aanpak).

Ik hoop uw vragen zo voldoende te hebben beantwoord.

Bedankt voor de suggestie,

Met vriendelijke groet,

Namens [REDACTED]

[REDACTED]

Arts-onderzoeker [REDACTED] UMC Groningen.

(1) Martin Yvette N YN. Sex differences in the pulmonary circulation: implications for pulmonary hypertension. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 2014-5;306(9):1253-64.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
HPC: FA 29  
9713 AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-2800028 (10 ct /min)

ZBO-CCD@minez.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

**Uw referentie**  
-

**Bijlagen**  
1

Datum 24 juni 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven digitaal ontvangen. Het gaat om uw project "Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" met aanvraagnummer AVD105002015129. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 9 juni 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld op basis van door het secretariaat van de CCD gestelde vragen.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag onder voorwaarde goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in het colofon.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

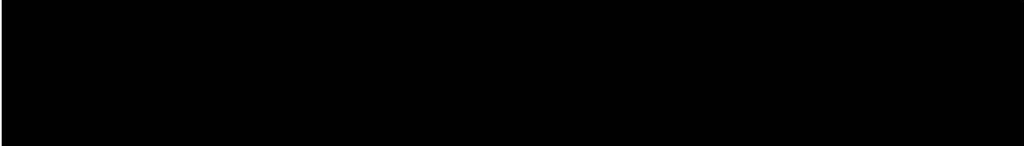
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen****- Vergunning**

- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen  
Adres: A. Deusinglaan 1 HPC: FA29  
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen  
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020, voor het project "Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" met aanvraagnummer AVD105002015129, volgens advies van dierexperimentencommissie DEC-RUG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 juni 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 juni 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 juni 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 juni 2015, ontvangen op 2 juni 2015.
  - d. Aanvullingen ontvangen op 9 juni 2015.

### Dierproeven

| Naam dierproef                                                                                          | Diersoort                    | Aantal dieren                                                                                                                 | Ernst |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Dierproef 1:<br>Flow- PAH<br><br>Pilot studie om de rol van geslacht op ziekteprogressie te onderzoeken | Ratten<br>Inbred/<br>outbred | 500 mannelijk<br><br>Aantal vrouwelijke dieren dat nodig is om een vergelijk te maken met de representatieve mannelijke groep | matig |
| Dierproef 2:<br>PAH-LTx                                                                                 | Ratten<br>inbred             | 450+ max 15%<br>Uitval= 525                                                                                                   | matig |

### Aanvullende voorwaarden:

Resultaten van de pilotstudie om rol van geslacht op ziekteprogressie te onderzoeken worden teruggekoppeld met de IvD. In het geval er geen verschil is tussen mannelijke en vrouwelijke dieren worden voor vervolgstudies in dit project beide geslachten in gelijke aantallen gebruikt.

In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze



vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt.

Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel

van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.