

	Inventaris Wob-verzoek W16-08S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015257								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	DEC-advies				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Mail uitnodiging gesprek 5-1-2016				x		x	x	
12	Addendum				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	

29 SEP. 2015



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 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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 1257 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 0 2 4 4 1 9 7</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn																
Postbus	12007																
Postcode en plaats	3501AA Utrecht																
IBAN	NL27INGB0000425267																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

- 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 _____ ☐ Dhr. ☐ Mw.
- Functie _____
- Afdeling _____
- Telefoonnummer _____
- E-mailadres _____
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- ☒ Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 _ 1 1 _ 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 _ 1 1 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.
☐ Via een eenmalige incasso
☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ☐ Melding Machtiging
- ☐

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:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - 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.
 - 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.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht
22-06-2015



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.
- 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.

Als gevolg van de vergrijzing van onze samenleving neemt het aantal patiënten met hart en vaatziekten de komende jaren dramatisch toe. Door verbeterde behandeling is het aantal doden ten gevolge van acute cardiovasculaire syndromen de laatste jaren sterk afgenomen. Helaas gaat deze afname hand in hand met een verhoogde incidentie van patiënten met hartfalen, wereldwijd lijden nu 23 miljoen mensen aan hartfalen (WHO). Wetenschappelijk onderzoek heeft tot de ontdekking van een aantal ondersteunende medicamenten geleid, zoals β -blockers, ACE-remmers en Angiotensine II receptor antagonisten (Braunwald E, JACC, 2013). Deze medicamenten kunnen de ernst van hartfalen gedeeltelijk verminderen maar kunnen hartfalen niet voorkomen of genezen. Hierom is er een sterke behoefte aan nieuwe therapieën aangezien, los van een harttransplantatie, geen genezende therapie voor hartfalen voorhanden is.

In de meeste gevallen wordt hartfalen veroorzaakt door een hartinfarct en/of door hoge bloeddruk (hypertensie). Bij een hartinfarct is vanwege een stolsel in een van de kransslagaders (tijdelijk) de bloedtoevoer naar het hart sterk verminderd of zelf volledig geblokkeerd. Hierdoor sterven hartspiercellen (cardiomyocyten), wat leidt tot een ontstekingsreactie in het hart en uiteindelijk tot het ontstaan van littekenweefsel. Bij een hoge bloeddruk ontstaat er drukoverbelasting van het hart waardoor er bindweefsel in het hart ontstaat. Door de vorming van dit bindweefsel verliest het hart pompkracht en heeft het meer moeite om het bloed rond te kunnen pompen (Burchfield JS, circulation, 2013).

Zowel na een hartinfarct als bij drukoverbelasting van het hart treedt een proces van ongunstig remodeleren van het hart op: bij schade aan het hart vindt celdood plaats en komen er stress signalen vrij wat via een speciale groep receptoren, de pattern recognition receptors, kan zorgen voor activering van het immuunsysteem. In eerste instantie zal het aangeboren (innate) immuunsysteem geactiveerd worden wat zorgt voor de productie van ontstekingsbevorderende pro-inflammatoire cytokines, activering van het complement systeem en het aantrekken van ontstekingscellen. De eerste cellen van het aangeboren immuunsysteem die worden aangetrokken zijn neutrofielen, op de voet gevolgd door macrofagen. Cellen van het adaptieve immuunsysteem, de T- en B-cellen, zijn ook betrokken bij de schadelijke ontstekingsreactie na hartschade (Frangogiannis NG, J Cardiovasc Pharmacol, 2014). Als gevolg van de inflammatoire omgeving in het hart worden hartfibroblasten geactiveerd waarna ze collageen gaan produceren en zo bijdragen aan bindweefselvorming (fibrosing) in het hart. Hiernaast vormen zich nieuwe bloedvaten, een proces dat angiogenese wordt genoemd. Ongunstige remodelatie van het hart wordt dus gekenmerkt door een vicieuze cirkel van verlies van cardiomyocyten, ontsteking (inflammatie) en fibrose wat zorgt voor verwijding (dilatatie) van het hart en uiteindelijk een verminderde hartfunctie. Dit resulteert bij hartfalen patiënten in klachten van (ernstige) kortademigheid, verminderde inspanningstolerantie en oedeem vorming, welke kunnen leiden tot een sterk verminderde kwaliteit van leven en uiteindelijk tot de dood. Om deze reden is het noodzakelijk de verschillende mechanismes in de ontwikkeling van hartfalen te ontrafelen zodat er nieuwe therapeutische toepassingen ontwikkeld kunnen worden om patiënten met hartfalen beter te kunnen behandelen. Onduidelijk is bijvoorbeeld nog de bijdrage van de verschillende delen van het immuunsysteem aan het ontstaan en de progressie van hartfalen. Wat is de rol van bijvoorbeeld B- en T-cellen? Wat is de rol van het complement systeem? Hetzelfde geldt voor bindweefselvorming, in hoeverre staat dit onder invloed van het immuunsysteem en kunnen we door dit te beïnvloeden het optreden van hartfalen vertragen? Dit onderzoek zal een bijdrage leveren aan het beantwoorden van deze vragen.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

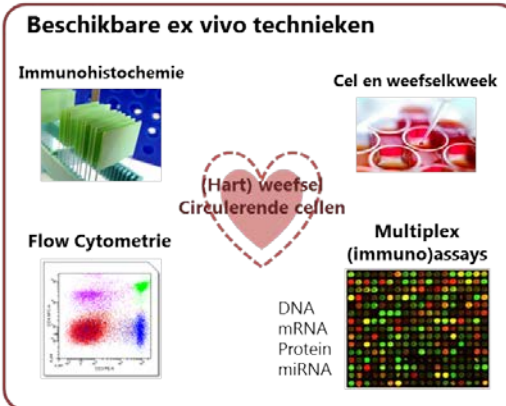
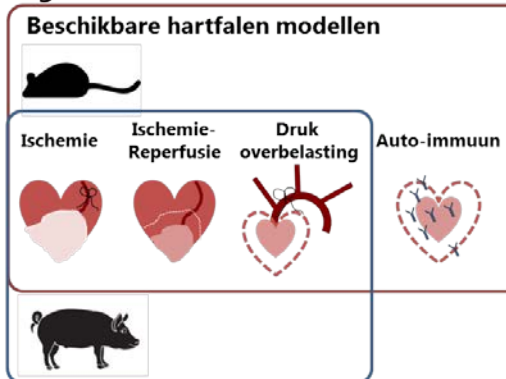
- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Dit voorstel heeft als doel verschillende processen in hartfalenontwikkeling te achterhalen om hiermee nieuwe therapeutische doelwitten voor de behandeling van hartfalen te identificeren. Wij zullen ons in het bijzonder richten op de betrokkenheid van inflammatoire en fibrotische processen in ongunstig remodeleren van het hart. Op basis van eerder onderzoek van ons lab en literatuur onderzoek hebben wij een aantal potentieel therapeutische doelwitten geïdentificeerd. Van een aantal processen is de betrokkenheid in ongunstig remodeleren van het hart al aangetoond en hier zal het onderzoek zich richten op de vervolgstap, namelijk het testen van therapeutische interventies (bijvoorbeeld medicamenteuze therapie) in een ziektemodel van hartfalen. Het hoofddoel is de translatie maken naar de klinische praktijk en nieuwe therapieën ontwikkelen voor patiënten met hartfalen. Omdat in de kliniek hartfalen verschillende oorzaken kan hebben, zullen wij gebruik maken van verschillende diersmodellen voor deze ziektebeelden. De meest voorkomende oorzaak voor het ontstaan van hartfalen is een myocard infarct, hiervoor hebben wij beschikking over het LAD ligatie model in zowel muis als varken. Een andere veel voorkomende oorzaak van hartfalen is drukoverbelasting van het hart, bijvoorbeeld veroorzaakt door een aortaklepstenose of hypertensie. Het beste diersmodel wat wij hiervoor tot onze beschikking hebben is het TAC model in de muis en het drukoverbelasting model in het varken. Ook myocardiitis is in de kliniek geregeld een oorzaak van hartfalen, waarvoor wij een muismodel tot onze beschikking hebben.

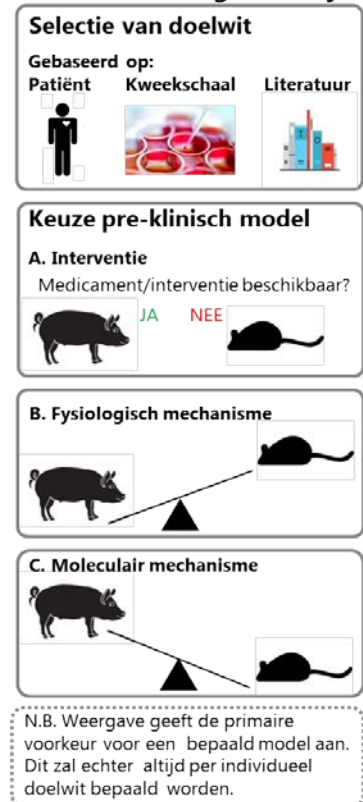
Voorbeelden van processen waarin wij geïnteresseerd zijn betreft de rol van het eiwit EDA-fibronectine in fibrose (Arslan F, Circ Res, 2011), het inflammasome in inflammatie (van Hout G, submitted), immunotherapie (Frodermann V, J. Immunology, 2015), stamcellen (van den Akker F, Mediators Inflamm, 2013; Sluijter J, Pharmacol Therapy, 2014; Koudstaal S, J Cardiovasc Transl Res, 2014) en miRNAs (van Mil A, J Mol Med, 2013) als mogelijke therapeutische interventie.

Bij interventie richten we ons op het onderdrukken van de ontwikkeling van hartfalen door modulatie van de ontstekingsreactie, fibrosering en vascularisatie van het aangedane hartweefsel. Stamcellen zijn vanwege het uitscheiden van paracrine factoren en hun immuunmodulerende werking interessant als therapeutische interventie voor hartfalen. Voor een overzicht met voorbeelden van targets waaraan wij als lab werken, zie tabel 1.

Figuur 1a: Modellen en technieken



1b: Besluitvorming werkwijze



Tabel 1: Voorbeelden van targets waaraan binnen ons lab gewerkt wordt/is.

Target	Modellen	Bronnen
Inflammatie		
GDF-15	TAC (muis)	<i>de Jager SC et al, J Exp Med, 2011</i>
Inflammasome	MI, TAC, myocarditis (muis)	<i>van Hout GP et al, Submitted</i>
Leucocyten/Neutrofielen	MI (varken)	<i>de Jager SC, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013</i>
C5aR	MI, TAC (muis)	<i>De Hoog VC et al, Cardiovasc Res, 2014</i>
Fibrose		
EDA-fibronektine	MI, TAC (muis)	<i>Arslan F et al, Circ Res, 2011</i>
GDF-15 (zie hierboven)	MI, TAC (muis)	<i>de Jager SC et al, J Exp Med, 2011</i>
Angiogenese		
MicroRNA's	MI, myocarditis (muis)	<i>Lei Z et al, J Cell Mol Med, 2015; Van Mil A et al, J Mol Med, 2013; Van Mil A et al, Cardiovasc Res, 2012</i>
CD200	MI (Muis)	<i>Van den Borne P et al, PLoS One, 2014</i>
Therapieën		
Stamceltherapie	MI (muis & varken), myocarditis (muis)	<i>Feyen et al, Cardiovasc Res, 2013; Geatani R et al, Biomaterials, 2015</i>
Farmacotherapie	MI (muis & varken), TAC (muis), myocarditis (muis)	<i>Timmers L et al, JACC, 2009</i>
Dentritische cellen	MI (muis)	<i>SC de Jager, J Immunol, 2015</i>
MicroRNA's	MI (muis), TAC (muis)	<i>Sluijter JP et al, Circ Res, 2015</i>

MI = myocard infarct; TAC = transverse aortic constriction

Binnen ons lab is ruime expertise aanwezig op het gebied van cardiovasculaire diermodellen evenals een groot scala aan laboratorium technieken die bijdragen aan verdere mechanistische onderbouwing van de vraagstelling (figuur 1). Binnen 5 jaar willen we het mechanisme achter het ontstaan van hartfalen, met specifieke aandacht voor het immuunsysteem en fibrose, beter in kaart gebracht hebben. Daarnaast streven wij naar identificatie van een potentieel therapeutisch doelwit. Dit zal primair in muizen gedaan worden. Is een doelwit zeer interessant voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën, of is er reeds een therapie beschikbaar, zal een (vervolg)studie gedaan worden in varkens. De keuze voor kleine of grote proefdieren is weergegeven in figuur 1. De keuze wordt op basis van verschillende gegevens bepaald en kan in bepaalde gevallen afwijken van het keuzemodel. Binnen 5 jaar is het zeker niet haalbaar zijn om de translatie naar de klinische praktijk te maken, dit is dan ook niet het doel van deze aanvraag. Binnen onze groep zijn meerdere postdocs werkzaam met verschillende expertises (fibrose, immunologie, inflammatie, immunotherapie, stamcellen, miRNA, microvesicles).

3.3 Belang

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

De incidentie van hartfalen neemt nog steeds toe en is wereldwijd een groot probleem. De ziekte is niet alleen verwoestend voor de levens van patiënten en naasten, maar zorgt ook voor grote druk op ons zorgstelsel. Het aantal ziekenhuis opnames voor hartfalen is de afgelopen jaren met zo'n 20% toegenomen. De overlevingskansen voor hartfalen patiënten zijn zeer gering met een sterftecijfer van 66% binnen 5 jaar na diagnose. Op dit moment lijden wereldwijd 23 miljoen mensen aan hartfalen (WHO) en gezien de verwachte toename in aantal patiënten in combinatie met het feit dat er op dit moment geen goede therapie beschikbaar is, is verder onderzoek naar nieuwe behandelingen van groot belang. Het is daarom essentieel om de ontstaanswijze en mechanismen bij de progressie van hartfalen te achterhalen om het ziektebeeld beter te begrijpen. Op deze manier kan gerichte therapie ontwikkeld worden. Zoals beschreven in onze doelstellingen zullen wij nieuwe potentieel therapeutische doelwitten aanwijzen, deze valideren in een groot proefdiermodel zodat in een later stadium deze naar de kliniek, de patiënt, gebracht kunnen worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Op basis van patiëntgegevens en literatuuronderzoek zullen wij nieuwe potentieel therapeutische doelwitten (targets) identificeren. Het klinisch beeld van hartfalen patiënten kan erg wisselen. Sommige patiënten ontwikkelen acuut hartfalen, bijvoorbeeld direct na een hartinfarct. Een andere patiëntenpopulatie is die met chronisch hartfalen. In de acute fase spelen inflammatoire processen een belangrijke rol terwijl in de chronische fase, naast ontsteking, fibrose vorming erg belangrijk is. Het tijdstip van ingrijpen en dus ook de patiëntenpopulatie waarop wij ons richten hangt af van het type doelwit. Een inflammatoir doelwit zal zich met name richten op de acute fase, hier moet als kanttekening bij geplaatst worden dat inflammatie naast fibrose ook een belangrijke rol heeft in chronisch hartfalen. Om het mechanisme en de rol van deze targets binnen ongunstig remodeleren van het hart te bestuderen zullen verschillende diersmodellen van hartfalen gebruikt worden.

Muis modellen voor hartfalen:

In eerste instantie zal in muismodellen, o.a. gebruik makend van knock-out muizen, de rol van het target in ongunstig remodeleren en hartfalen bestudeerd worden. Aangezien er verschillende ontstaanswijzen van hartfalen bestaan zullen wij binnen deze aanvraag gebruik maken van 3 verschillende muismodellen van ongunstig remodeleren uiteindelijk leidend tot hartfalen: 1) hartfalen als gevolg van ischemie (myocard infarct), 2) drukoverbelasting (diastolisch hartfalen) en 3) ontstekingsreacties (myocarditis). Deze drie ontstaanswijzen van hartfalen verschillen onderling van elkaar maar resulteren allen in ongunstige remodelering van de hartspier. Van deze drie ontstaanswijzen van hartfalen bestaan (inter-)nationaal geaccepteerde diersmodellen waar wij binnen ons lab ruime ervaring mee hebben. Ischemisch hartfalen kan geïnduceerd worden middels een ligatie van de linker kransslagader (LAD ligatie). Transverse aortic constriction (TAC) is het geaccepteerde model voor drukoverbelasting van het hart. Myocarditis wordt geïnduceerd door het opwekken van een auto-immuun reactie gericht tegen het hart. Om te bepalen of het effect van een potentieel therapeutisch doelwit veroorzaakt wordt door de activiteit van het doelwit in cellen uit het beenmerg of door het hart zelf zullen wij binnen deze muismodellen soms gebruik maken van chimeer experimenten. Dit wordt gedaan door middel van een beenmergtransplantatie. Dit is belangrijk voor het achterhalen van het werkingsmechanisme en kan van belang zijn voor gerichte therapeutische therapie. Als het werkingsmechanisme van een potentieel doelwit aangetoond is zal in diezelfde muismodellen therapeutische interventies getest worden, bijvoorbeeld medicamenteuze therapie. Omdat de translatie van een muis naar een mens lastig is zullen wij naast de hieronder beschreven varkensmodellen ook gebruik maken van een gehumaniseerd muismodel. Deze muizen hebben het immuunsysteem van de mens waardoor het effect van interventies gericht op het immuunsysteem van deze muizen beter te transleren is naar de patiënt.

Varkensmodellen voor hartfalen:

Een volgende stap in het onderzoek naar hartfalen zijn varkensmodellen. De anatomie van het hart en de fysiologie van het varken komen nauw overeen met dat van de mens en dit is dus een translationele stap naar de kliniek waar patiënten met hartfalen behandeld zullen worden. Bij varkens hebben wij eveneens ruime ervaring met ischemische modellen en hebben we sinds kort een model voor diastolisch hartfalen (drukoverbelastingmodel) beschikbaar.

Fokstrategieën: De verschillende (KO) muislijnen zijn reeds in huis aanwezig of zullen van extern betrokken worden. Er zullen geen nieuwe KO dieren door ons zelf gegenereerd worden. Om een zo homogeen mogelijke genetische en microbiotische achtergrond van onze muizen te hebben zullen wij onze knock-out muizen heterozygoot fokken. Dit houdt in dat heterozygote muizen gefokt zullen worden en hieruit de wildtype en knock-out muizen gebruikt worden voor de experimenten. Beide groepen muizen komen dus voort uit dezelfde ouders en eenzelfde genetische achtergrond hebben. De fokken worden altijd ingezet naar behoefte en z.s.m. na voltooiing experimenten teruggebracht worden tot een minimale onderhoudsfok. We streven naar gelijkmatig gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren. Experimenten in gehumaniseerde muismodellen zullen uitbesteed worden aan een externe partner.

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

De volgende diermodellen van ongunstig remodeleren leidend tot hartfalen zullen gebruikt worden:

1. Hartfalen als gevolg van ischemie(/reperfusie) schade (zowel muis als varken)
2. Hartfalen als gevolg van drukoverbelasting middels TAC (zowel muis als varken)
3. Hartfalen als gevolg van chronische myocarditis (muis)

Als het gaat om muismodellen zal frequent gebruik gemaakt worden van knock-out modellen om het werkingsmechanisme van een mogelijk therapeutisch doelwit te ontrafelen. In de varkensmodellen zal er vaak een interventiegroep (bijvoorbeeld: medicament of cellulaire therapie) vergeleken worden met een placebo groep

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.

Het doel van dit projectvoorstel is nieuwe therapeutische doelwitten voor de behandeling van hartfalen te definiëren en ontwikkelen. Voor dit proces zijn een aantal opeenvolgende stappen nodig:

1. Het identificeren van een mogelijk potentieel doelwit/ophelderen van een mechanisme (op basis van patientengegevens, bestaande celmodelsystemen in het laboratorium of literatuur).
2. Het bewijzen van de betrokkenheid van een mechanisme/doelwit in ongunstig remodeleren en de ontwikkeling van hartfalen (middels knock-out muizen).
3. Het ontwikkelen en testen van een interventie zoals een medicament in een muismodel van hartfalen.
4. Het testen van een therapeutische interventie in een varkensmodel van hartfalen.

Het onderzoek naar een nieuw potentieel betrokken mechanisme zal dus altijd gefaseerd plaatsvinden en de opeenvolgende stappen doorlopen zoals hierboven beschreven. Aan het eind van een stap zal altijd geëvalueerd worden of gecontinueerd zal worden met de vervolgstap. Er zal overgegaan worden op een varkensmodel als de interventie werkzaam blijkt in het muismodel, uitgedrukt in een verbeterde functie van het hart na het induceren van hartfalen in vergelijking met een controle/placebo groep, of als er al een medicament beschikbaar is.

Hierboven zijn een aantal mechanismen genoemd waarop onze focus zal komende te liggen. Het verschilt per doelwit hoeveel kennis/onderzoek we al naar dit doeleiwit hebben gedaan en het hoeft daarom niet noodzakelijk zijn alle stappen vanaf het begin te doorlopen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Ischemisch hartfalen (LAD ligatie), muis
2	Hartfalen als gevolg van drukoverbelasting (TAC), muis
3	Hartfalen als gevolg van myocarditis, muis
4	Ischemisch hartfalen (LAD ligatie en reperfusie), varken
5	Hartfalen als gevolg van drukoverbelasting, varken
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.
- 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 het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Ischemisch hartfalen (LAD ligatie), muis

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.

Binnen deze bijlage zal hartfalen geïnduceerd worden middels een ligatie om de linker coronair arterie wat zorgt voor ischemie (zuurstoftekort) van het hart. Middels dit model kan een hartinfarct worden nagebootst. Dit model is een veel gebruikt diermodel binnen het onderzoek naar hartfalenontwikkeling (Xu et al, Jove, 2014; Toldo et al, Circulation, 2014; Patten et al, Circulation, 2009; Xu et al, J Vis Exp, 2014) en binnen onze onderzoeksgroep is veel ervaring met dit model (Arslan et al, Stem Cell Research, 2013; De Hoog et al, Cardiovascular research, 2014)

Wij zullen gebruik maken van chronische ligatie/ischemie van het hart en van een reperfusie model, wat het heropenen van de coronair arterie tijdens een dotterbehandeling representeert. De ligatie zal geplaatst worden om de linker coronair arterie (LAD) welke een belangrijk deel van het hart van bloed voorziet. Net zoals bij de andere hartfalenmodellen zal de ontwikkeling van hartfalen gekenmerkt worden door een proces van ongunstig remodeleren van het hart. Dit ontstaat in eerste instantie door het afsterven van de hartspiercellen (cardiomyocyten) als gevolg van de ischemie, gevolgd door ontsteking (inflammatie), fibrose, dilatatie van het hart en uiteindelijk een verminderde hartfunctie. Als primaire uitkomstvariabele zal gekeken worden naar eind-diastolisch volume van het hart als klinische surrogaat marker voor de mate van hartfalen. Een eerste doeleiwit waar we geïnteresseerd in zijn is een immuunmodulerend eiwit genaamd LAIR (Lebbink et al, Int Immunol, 2007). LAIR kan binden aan de LAIR receptor welke tot expressie komt op neutrofielen die in weefsel penetreren na schade of ontsteking. LAIR zelf wordt uitgescheiden door verschillende ontstekings en stromale cellen en heeft de potentie immuunreacties te onderdrukken. Gezien de belangrijke rol voor neutrofielen in schade en ontsteking in ischemie kan therapeutische targeting van LAIR bijdragen aan verbeterd herstel van de hartspier na ischemie. Op dit moment bestuderen we de rol van de afwezigheid van LAIR in ischemie schade en wordt er gewerkt aan een therapeutisch antilichaam gericht tegen LAIR welke we in vervolg studies kunnen gaan toepassen.

Om te bepalen of het effect van een potentieel therapeutisch doelwit veroorzaakt wordt door de activiteit van dat target in cellen uit het beenmerg of door overige cellen in het lichaam zullen ook LAD ligatie experimenten in chimeer muizen worden uitgevoerd. Dit wordt gedaan door beenmerg van wildtype muizen in bestraalde knock-out muizen te transplanteren en vice versa. De wildtype beenmerg-->wildtype muizen en knock-out beenmerg -->knock-out muizen zijn de controle groepen voor deze experimenten.

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.

De dieren zullen achtereenvolgens de volgende behandelingen ondergaan:

1. baseline hartfunctie meting middels echocardiografie onder narcose (isofluraan, inhalatie), waarna ontwaken
2. Thorax operatie onder algehele anesthesie (fentanyl:dormicum:domitor, intraperitoneaal): inductie ischemie middels ligatie linker coronair arterie (LAD), eventueel gevolgd door reperfusie (verwijderen van de ligatie); sluiten thorax (sham operatie in een subgroep). Na de operatie ontvangen de muizen pijnstilling (buprenorfine, subcutaan)
3. Echografie na de ischemie om de hartfunctie te bepalen. Tijdstippen echografie afhankelijk van onderzoeksvraag. Meestal na 1, 2 en 4 weken.
4. Terminaal experiment onder narcose; explantatie bloed en organen voor labanalyse. Tijdstip terminatie afhankelijk van onderzoeksvraag.
5. Tijdens experiment worden de muizen frequent gewogen.

De verschillende tijdstippen van echografie en terminatie zijn gebaseerd op moleculaire en cellulaire veranderingen, en hangt dus af van de specifieke onderzoeksvraag:

2-7 dagen: Piek van inflammatie. De acute effecten van de ischemie(/reperfusie) schade kunnen geëvalueerd worden en de infarctgroottes tussen de groepen kunnen vergeleken worden

14-28 dagen: Het infarctgebied heeft zich geremodeleerd en er is fibrose opgetreden. De dieren hebben hartfalen ontwikkeld en de pompfunctie is achteruit gegaan.

3 maanden: Om de effecten van een therapie op lange termijn te bestuderen zullen we een aantal dieren 3 maanden laten overleven.

In het geval van de chimeer experimenten zal aan bovengenoemd LAD ligatie protocol de volgende behandelingen voorafgaan:

1. Terminaal experiment: Het dier wordt middels een cervicale dislocatie getermineerd. Femur en humerus worden beiderzijds blootgelegd en beenmerg

wordt geaspireerd.

2. Beenmerg transplantatie in de acceptoren (na rontgenbestraling; 7 Gy) middels intraveneuze (staart vene) injectie van donor beenmerg (5×10^6 cellen in 0.25 ml). Hierna volgt een periode van 6 weken herstel, waarin het beenmerg zich nestelt in de gast. Gedurende deze periode worden de dieren onder een filtertop gehouden, ter vermindering van infectiegevaar.

3. Toediening van water met ciprofloxacin twee dagen vóór bestraling tot 14 dagen na bestraling vanwege de tijdelijk verminderde weerstand.

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

De studie is gepowerd op de primaire uitkomstparameter eind-diastolisch volume welke middels echografie bepaald zal worden. De volgende statistische berekening is uitgevoerd om het aantal dieren tot een minimum te beperken:

Power: 90%, Alpha: 0,05, SD: 12,5 ul (Arslan et al, circulation research, 2011), Gewenst effect: 17.5 ul

Dit geeft $n=12$ per groep (gecorrigeerd voor multiële vergelijkingen). Uit ervaring van ons lab is gebleken dat als gevolg van de procedure er een mortaliteit is van 20%. Dit geeft in totaal 15 dieren per groep. Om hartfalen ten gevolge van ischemie te induceren dient voldoende schade aangebracht te worden aan het hart. Het is daarom noodzakelijk de LAD ligatie hoog te plaatsen waardoor de mortaliteit van deze procedure 20% is en blijft. Het is helaas niet mogelijk om de ernst van de schade geïnduceerd door de ligatie te verminderen aangezien hartfalen een ernstig ziektebeeld is.

Naast de 15 dieren per experimentele groep zullen er 6 sham muizen per groep per tijdstip en 6 baseline terminaties per groep ingezet worden.

B. De dieren

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

Diersoort: Muizen. De verschillende transgene lijnen zijn reeds in huis aanwezig en worden heterozygoot gefokt of zullen van extern betrokken worden. In het geval we gebruik maken van transgene of knock-out muizen zullen wildtype muizen betrokken worden vanuit een heterozygote fok. In het geval van een interventie studie zal veelal gebruik gemaakt worden van wildtype muizen (BALB/c en C57BL/6) welke betrokken zullen worden van een erkende leverancier. De klassieke presentatie van een hartinfarct wordt met name gezien bij mannen en vanuit die visie zijn in het verleden voornamelijk mannelijke dieren gebruikt. Er is op dit moment echter veel aandacht voor het ontstaan van een hartinfarct bij vrouwen. Voor de experimenten in het kader van deze aanvraag zal afhankelijk van de specifieke vraagstelling, gebruik gemaakt worden van danwel mannelijk of vrouwelijk dieren. Indien er gerichte vraagstelling bestudeerd wordt naar de verschillen tussen mannen en vrouwen zullen beiden geslachten gebruikt worden binnen hetzelfde experiment.

Levenstadia: De dieren zullen worden opgenomen in het experiment bij een leeftijd van 10-12 weken.

Geschatte aantallen: Zoals hierboven beschreven zullen 15 dieren per groep nodig zijn en hiernaast 6 sham/baseline dieren. Per werkprotocol zullen de dieren worden verdeeld over de volgende experimentele groepen:

1. baseline terminatie ($n=2$ (wildtype vs knock-out of placebo vs interventie) $\times 6 = 12$)

2. terminatie (meestal) op 3 tijdstippen na het induceren van ischemie (meestal, 1,2 en 4 weken na ligatie) ($n=3 \times 2 \times 15 + 3 \times 2 \times 6 = 126$)

Totaal: 138 dieren Wildtype/placebo: 69 knock-out/interventie: 69

In het geval van de chimeer experimenten zullen er 4 experimentele groepen zijn per tijdstip:

1. knock-out muis + wildtype beenmerg ($n=15$)

2. wildtype muis + knock-out beenmerg ($n=15$)

3. wildtype muis + wildtype beenmerg (n=15)
4. knock-out muis + knock-out beenmerg (n=15)
+ dieren voor het verkrijgen van beenmerg: $5 \times 2 = 10$
Totaal: 70 dieren wildtype: 35 knock-out: 35

Zoals in het projectvoorstel genoemd zullen wij verschillende mogelijke mechanismen en interventies testen. Om een doelwit goed te bestuderen is het in de praktijk nodig dat gekeken wordt naar knock-out muizen, muizen die het gen tot overexpressie brengen en farmacologische inhibitie/stimulatie van het desbetreffende doelwit. Ook is het belangrijk om hiernaast chimeer experimenten uit te voeren om het verschil tussen circulerende cellen uit het beenmerg en de cellen in het hart aan te tonen. Om de gevonden resultaten te valideren is het tegenwoordig een vereiste dat de experimenten minimaal eenmalig herhaald worden.

Dit geeft per doelwit: $138 \text{ muizen} \times 3 \text{ (studieopzet)} \times 2 \text{ (validatie)} + 70 \times 2 \text{ (chimeren)} = 968 \text{ dieren}$

De komende 5 jaar verwachten wij dat binnen onze gehele groep 10 verschillende targets bestudeerd zullen worden binnen dit model van LAD ligatie.

Hiervoor verwijzen wij naar het projectvoorstel waar een aantal voorbeelden van onze targets genoemd zijn.

Dit komt op een totaal van: $968 \times 10 \text{ targets} = 9680 \text{ muizen}$.

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: Hartfalen is een complex ziektebeeld waarbij meerdere celtypen, paracrine factoren en mechanismen zoals drukoverbelasting een rol spelen. De hypothesen waarop dit onderzoek gebaseerd zijn komen voort uit patientendata of in vitro experimenten in het laboratorium. Omdat experimenten naar nieuwe medicijnen voor hartfalen niet mogelijk is bij mensen is het nu helaas noodzakelijk om levende dieren te gebruiken om de rol van het verscheidene inflammatoire en fibrotische processen in het ziektebeeld hartfalen als geheel te kunnen bestuderen.

Vermindering: Zoals genoemd zijn eerst uitvoerig de mogelijke therapeutische doelwitten bestudeerd in patientendata, de literatuur en het laboratorium, bijvoorbeeld in een kweekschaal. Dit voorkomt dat er onnodige dierexperimenten uitgevoerd worden. Er zal alleen overgegaan worden op een dierexperiment als een doelwit potentieel therapeutische mogelijkheden oplevert. Voordat wordt overgegaan op een diermodel zal hierom binnen ons laboratorium overleg

plaats vinden met de betrokken principal investigators om het nut van het experiment vast te stellen.

Verfijning: De toegepaste operatietechnieken worden regelmatig uitgevoerd (en zonodig opnieuw getraind op maximaal 5 muizen) om de bekwaamheid te onderhouden. Muizen worden in een groep gehuisvest, inclusief kooiverrijking. Muizen zullen worden geopereerd onder aseptische omstandigheden en er zal gebruik worden gemaakt van een warmte-mat na chirurgie gedurende 24 uur. Daarnaast zullen de muizen gedurende enkele dagen na de operatie pijnstilling ontvangen om het ongerief te verminderen.

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.

Zoals hierboven beschreven krijgen de dieren gedurende de eerste twee dagen na operatie pijnstilling. De muizen zullen in groepen gehuisvest worden wat angst zal verminderen.

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.

Als lab zijn wij zeer actief in het onderzoek naar hartfalen. Hierdoor zijn wij goed op de hoogte van de literatuur binnen dit vakgebied. Wij zullen enkel studies uitvoeren waarvan op basis van gedegen literatuur onderzoek blijkt dat eenzelfde dierproef niet eerder is uitgevoerd.

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?

kortademigheid (als gevolg van vochtophoping in de longen) en gewichtsverlies

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van het de ligatie van de coronairarterie ondergaan de dieren een hartinfarct, hierdoor zal hartfalen ontstaan. De symptomen hiervan betreffen kortademigheid en gewichtsverlies.

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

Het voorkomen van deze schadelijke effecten binnen de proef is niet mogelijk aangezien het noodzakelijk is voor het experiment dat de dieren hartfalen ontwikkelen. Wel zullen wij de dieren nauwkeurig monitoren, frequent gewichtscontroles uitvoeren en zoals hieronder beschreven een duidelijk humaan eindpunt omschrijven.

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.

Dieren worden uit proef genomen bij 15% gewichtsverlies in 1 a 2 dagen na chirurgie t.o.v. individueel gewicht kort voor chirurgie (dag 0) en dieren dienen uiterlijk 7 dagen na chirurgie tekenen van gewichtsherstel te vertonen. Daarnaast worden dieren uit proef genomen bij 20% gewichtsverlies tijdens de gehele duur van het experiment t.o.v. individueel gewicht kort voor chirurgie (dag 0). Weegmomenten zullen plaatsvinden direct voor of aansluitend op de echometingen. Op indicatie van vermagering/gewichtsverlies, te zien door zichtbaarheid van ribben/ruggengraat, zal een extra weegmoment opgenomen worden. Ook bij sterk verminderde activiteit/mobiliteit zal worden besloten tot voortijdige euthanasie om het ongerief zo veel mogelijk te beperken

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

Alle dieren welke een ligatie van de coronairarterie ondergaan lopen de kans op hartfalen en hierdoor gewichtsverlies. Het percentage wat dit humane eindpunt zal bereiken is naar onze ervaring maximaal 10%.

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.

35% van de dieren ondergaat een sham operatie of wordt op baseline getermineerd. Dit ongerief wordt ingeschat op: matig.

65% van de dieren ondergaat een LAD ligatie en ontwikkelt hartfalen, dit ongerief is: ernstig. de helft van deze dieren (32.5% van het totaal) zal ofwel een behandeling ondergaan of zodanig genetisch gemodificeerd zijn dat onze verwachting is dat na de LAD ligatie de hartfunctie (ejectie fractie) in mindere mate daalt t.o.v. de wildtype dieren. Deze dieren zullen dus naar onze verwachting geen, of in mindere mate, hartfalen ontwikkelen met als gevolg ook verminderd ongerief. Of dit tot een vermindering van ernstig naar matig ongerief zal leiden is op voorhand moeilijk in te schatten.

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.

Aan het einde van de studie dienen de organen van de muis bestudeerd te worden. Zo zullen wij onder andere kijken naar het hart op microscopisch niveau. Dit kan enkel als het dier getermineerd wordt aan het einde van de proef. Hiernaast is het niet ethisch om de dieren welke hartfalen hebben ontwikkeld langer dan nodig voor het experiment te laten overleven.

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.
- 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 het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Hartfalen als gevolg van drukoverbelasting (TAC), muis

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.

Binnen deze bijlage zal hartfalen geïnduceerd worden middels transverse aortic constriction (TAC) wat zorgt voor drukoverbelasting van het hart. Bij patiënten komt drukoverbelasting van het hart voor bij hoge bloeddruk (hypertensie) en bijvoorbeeld bij een aortaklep vernauwing. Bij TAC wordt de grote slagader van het lichaam (de aorta) vernauwd waardoor het hart tegen een hogere druk op moet pompen. Net zoals bij de andere hartfalenmodellen zal de ontwikkeling van hartfalen gekenmerkt worden door een proces van ongunstig remodeleren van het hart. Dit ontstaat door een vicieuze cirkel van ontsteking (inflammatie), verdikking van de hartspier (hypertrofie) gevolgd door verlies van hartspiercellen (cardiomyocyten) en fibrose wat zorgt voor dilatatie van het hart en uiteindelijk een verminderde hartfunctie. Als primaire uitkomstvariabele zal gekeken worden naar eind-diastolisch volume van het hart als klinische

surrogaat marker voor de mate van hartfalen. Het TAC model is een veel gebruikt diermodel in het onderzoek naar hartfalenontwikkeling (deAlmeida AC et al, Jove, 2010; Patten RD, Circulation, 2009) en binnen onze onderzoeksgroep is veel ervaring met dit model (el Azzouzi H et al, 2010, Eur J Heart Fail).

Om te bepalen of het effect van een potentieel therapeutisch doelwit veroorzaakt wordt door de activiteit van dat doelwit in cellen uit het beenmerg of door overige cellen in het lichaam zullen ook TAC experimenten in chimeer muizen worden uitgevoerd. Dit wordt gedaan door beenmerg van wildtype muizen in bestraalde knock-out muizen te transplanteren en vice versa. De wildtype beenmerg--> wildtype muizen en knock-out beenmerg--> knock-out muizen zijn de controle groepen voor deze experimenten.

GDF-15 is een ontstekings-eiwit dat tot expressie komt in bijna alle lichaamsweefsels, maar onder condities van ontsteking neemt de productie van GDF-15 scherp toe. GDF-15 speelt een rol in veel ziekteprocessen (de Jager, J. Exp. Med. 2011) en wordt veelvuldig gebruikt als markeerstof voor cardiovasculaire ziekteprogressie zoals ook in hartfalen. GDF15 heeft een prominente rol in regulatie van het immuunsysteem, maar ook een rol spelen bij fibrosering van hartweefsel zoals we ook zien bij hartfalen. GDF-15 is een van de doeleiwitten waarvan de rol in hartfalen gaan bestuderen.

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.

De dieren zullen achtereenvolgens de volgende behandelingen ondergaan:

1. baseline hartfunctie meting middels echocardiografie onder narcose (isofluraan, inhalatie), waarna ontwaken
2. Thorax operatie onder algehele anesthesie (Fentanyl:dormicum:domitor, intraperitoneaal): plaatsen van TAC middels een ligatie rondom een 27G stompe naald, die hierna verwijderd wordt. Hierdoor ontstaat een diameter van 27G van de aorta ascendens ter hoogte van de ligatie;sluiten thorax (deel sham operatie). Na de operatie ontvangen de muizen pijnstilling (buprenorfine, subcutaan)
3. Echografie na het plaatsen van de TAC om de hartfunctie te bepalen. Tijdstippen echografie afhankelijk van onderzoeksvraag. Meestal na 1, 3 en 6 weken.
4. Terminaal experiment onder narcose; explantatie bloed en organen voor labanalyse. Tijdstip terminatie afhankelijk van onderzoeksvraag.
5. Tijdens experiment worden de muizen frequent gewogen.

De verschillende tijdstippen van echografie en terminatie zijn gebaseerd op moleculaire en cellulaire veranderingen, en hangt dus af van de specifieke onderzoeksvraag:

- 3-7 dagen: piek van inflammatie. Op dit tijdstip kunnen de acute effecten van het plaatsen van de TAC geëvalueerd worden.
21 dagen: op dit punt is de hartspeer verdikt (hypertrofie) en start het proces van fibrosering/collageen formatie.
42 dagen: de muizen hebben hartfalen ontwikkeld, het hart is gedilateerd (vergroot) en de pompfunctie is achteruit gegaan.

In het geval van de chimeer experimenten zal aan bovengenoemd TAC experiment de volgende behandelingen voorafgaan:

1. Terminaal experiment: Het dier wordt middels een cervicale dislocatie getermineerd. Femur en humerus worden beiderzijds blootgelegd en beenmerg wordt geaspireerd.
2. Beenmerg transplantatie in de acceptoren (na röntgenbestraling; 7 Gy) middels intraveneuze (staart vene) injectie van donor beenmerg (5x10E6 cellen in 0.25 ml). Hierna volgt een periode van 6 weken herstel, waarin het beenmerg zich nestelt in de gast. Gedurende deze periode worden de dieren onder een filtertop gehouden, ter vermindering van infectiegevaar.
3. Toediening van water met ciprofloxacin twee dagen vóór bestraling tot 14 dagen na bestraling vanwege de tijdelijk verminderde weerstand.

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

De studie is gepowerd op de primaire uitkomstparameter eind-diastolisch volume welke middels echografie bepaald zal worden. De volgende statistische berekening is uitgevoerd om het aantal dieren tot een minimum te beperken:

Power: 90%, Alpha: 0,05, SD: 0.23 mm (bron: Xia et al, Histochem Cell Biol, 2009), Gewenst effect: 0.35 mm. Gecorrigeerd voor multiële vergelijkingen geeft dit: n=12 per groep per tijdstip.

Uit ervaring van ons lab is gebleken dat als gevolg van de procedure er een mortaliteit is van 20%. Dit geeft in totaal 15 dieren per groep. Ondanks optimale operatietechnieken blijft de mortaliteit van deze procedure 20%, dit heeft te maken met de ernst van het hartfalen dat de dieren ontwikkelen. Helaas is dit een ernstig ziektebeeld en is het niet te voorkomen dat er dieren uitvallen tijdens het experiment.

Naast de 15 dieren per experimentele groep zullen er 6 sham muizen per groep per tijdstip en 6 baseline terminaties per groep ingezet worden.

B. De dieren

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

Diersoort: Muizen. Wildtype muizen zullen vergeleken worden met knock-out muizen of een placebogroep met een interventiegroep. Het soort muis dat gebruikt zal worden is afhankelijk van het ras waarin de knock-out muis is opgewekt. Wij zullen onder andere gaan werken met BALB/c en C57BL/6 muizen. Deze dieren zullen voortkomen uit een fok die wij zelf in beheer hebben. Gezien deze vorm van hartfalen ongeveer evenveel voorkomt bij mannen als vrouwen zal er, afhankelijk van de specifieke vraagstelling, gebruik gemaakt worden van danwele mannelijke of vrouwelijk dieren. Indien er gerichte interesse bestaat naar de verschillen tussen mannen en vrouwen zullen beiden geslachten gebruikt worden in hetzelfde experiment.

Levenstadia: De dieren zullen worden opgenomen in het experiment bij een leeftijd van 10-12 weken.

Geschatte aantallen: Zoals hierboven beschreven zullen 15 dieren per groep nodig zijn en hiernaast 6 sham/baseline dieren. Per werkprotocol zullen de dieren worden verdeeld over de volgende experimentele groepen:

1. baseline terminatie (n=2 (wildtype vs knock-out of placebo vs interventie) x6 =12)
2. terminatie (meestal) op 3 tijdstippen na TAC (meestal, 1,3 en 6 weken na TAC) (n=3x2x15 + 3x2x6 =126)

Totaal: 138 dieren Wiltype/placebo: 69 knock-out/interventie: 69

In het geval van de chimeer experimenten zullen er 4 experimentele groepen zijn per tijdstip:

1. knock-out muis + wildtype beenmerg (n=15)
 2. wildtype muis + knock-out beenmerg (n=15)
 3. wildtype muis +wildtype beenmerg (n=15)
 4. knock-out muis + knock-out beenmerg (n=15)
- + dieren voor het verkrijgen van beenmerg: 5x2=10

Totaal: 70 dieren wildtype: 35 knock-out: 35

Zoals in het projectvoorstel genoemd zullen wij verschillende mogelijke mechanismen en interventies testen. In het eerste werkprotocol hebben wij beschreven dat om een doelwit goed te bestuderen het in de praktijk nodig is dat gekeken wordt naar knock-out muizen, muizen die het gen tot overexpressie brengen en farmacologische inhibitie/stimulatie van het desbetreffende doelwit. Ook is het belangrijk om hiernaast chimeer experimenten uit te

voeren om het verschil tussen circulerende cellen uit het beenmerg en de cellen in het hart aan te tonen. Om de gevonden resultaten te valideren is het tegenwoordig een vereiste dat de experimenten minimaal eenmalig herhaald worden.

Dit geeft per doelwit: 138 muizen x 3 (studieopzet) x 2 (validatie) + 70 x 2 (chimeren) = 968 dieren

De komende 5 jaar verwachten wij dat binnen onze gehele groep 5 verschillende targets bestudeerd zullen worden binnen dit TAC model. Hiervoor verwijzen wij naar het projectvoorstel waar een aantal voorbeelden van onze targets genoemd zijn.

Dit komt op een totaal van: $968 \times 5 = 4840$ dieren

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: Hartfalen is een complex ziektebeeld waarbij meerdere celtypes, paracrine factoren en mechanismen zoals drukoverbelasting een rol spelen. De hypothesen waarop dit onderzoek gebaseerd zijn komen voort uit in vitro experimenten in het laboratorium. Omdat experimenten naar nieuwe medicijnen voor hartfalen niet mogelijk is bij mensen is het nu helaas noodzakelijk om levende dieren te gebruiken om de rol van het verscheidene inflammatoire en fibrotische processen in het ziektebeeld hartfalen als geheel te kunnen bestuderen.

Vermindering: Zoals genoemd zijn eerst uitvoerig de mogelijke therapeutische doelwitten gebestudeerd in de literatuur en het laboratorium, bijvoorbeeld in een kweekschaal. Dit voorkomt dat er onnodige dierexperimenten uitgevoerd worden. Er zal alleen overgegaan worden op een dierexperiment als een doelwit potentieel therapeutische mogelijkheden oplevert. Voordat wordt overgegaan op een diermodel zal hierom binnen ons laboratorium overleg plaats vinden met de betrokken principal investigators om het nut van het experiment vast te stellen.

Verfijning: De toegepaste operatietechnieken worden regelmatig uitgevoerd (en zonodig opnieuw getraind op 5 muizen) om de bekwaamheid te onderhouden. Muizen worden in een groep gehuisvest, inclusief kooiverrijking. Muizen zullen worden geopereerd onder aseptische omstandigheden en er zal gebruik worden gemaakt van een warmte-mat na chirurgie gedurende 24 uur. Daarnaast zullen de muizen gedurende enkele dagen na de operatie pijnstilling ontvangen om het ongerief te verminderen.

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.

Zoals hierboven beschreven krijgen de dieren gedurende de eerste twee dagen na operatie pijnstilling. De muizen zullen in groepen gehuisvest worden wat angst zal verminderen.

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.

Als lab zijn wij zeer actief in het onderzoek naar hartfalen. Hierdoor zijn wij goed op de hoogte van de literatuur binnen dit vakgebied. Wij zullen enkel studies uitvoeren waarvan op basis van gedegen literatuur onderzoek blijkt dat eenzelfde dierproef niet eerder is uitgevoerd.

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?

kortademigheid (als gevolg van vochtophoping in de longen) en gewichtsverlies

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de TAC zal hartfalen optreden. De symptomen hiervan betreffen kortademigheid en gewichtsverlies. Dit ontstaat door drukoverbelasting van het hart waardoor er vocht kan ophopen in de longen.

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

Het voorkomen van deze schadelijke effecten binnen de proef is niet mogelijk aangezien het noodzakelijk is voor het experiment dat de dieren hartfalen ontwikkelen. Wel zullen wij de dieren nauwkeurig monitoren, frequent gewichtscontroles uitvoeren en zoals hieronder beschreven een duidelijk humaan eindpunt omschrijven.

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.

Dieren worden uit proef genomen bij 15% gewichtsverlies in 1 a 2 dagen na chirurgie t.o.v. individueel gewicht kort voor chirurgie (dag 0) en dieren dienen uiterlijk 7 dagen na chirurgie tekenen van gewichtsherstel te vertonen. Daarnaast worden dieren uit proef genomen bij 20% gewichtsverlies tijdens de gehele duur van het experiment t.o.v. individueel gewicht kort voor chirurgie (dag 0). Weegmomenten zullen plaatsvinden direct voor of aansluitend op de echometingen. Op indicatie van vermagering/gewichtsverlies, te zien door zichtbaarheid van ribben/ruggengraat, zal een extra weegmoment opgenomen worden. Ook bij sterk verminderde activiteit/mobiliteit zal worden besloten tot voortijdige euthanasie om het ongerief zo veel mogelijk te beperken

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

Alle dieren welke een TAC operatie ondergaan lopen de kans op hartfalen en hierdoor gewichtsverlies. Het percentage wat dit humane eindpunt zal bereiken is naar onze ervaring maximaal 10%.

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.

35% van de dieren ondergaat een sham operatie of wordt op baseline getermineerd. Dit ongerief wordt ingeschat op: matig.

65% van de dieren ondergaat een TAC operatie en ontwikkelt hartfalen, dit ongerief is: ernstig. de helft van deze dieren (32.5% van het totaal) zal ofwel een behandeling ondergaan of zodanig genetisch gemodificeerd zijn dat onze verwachting is dat na de TAC de hartfunctie (ejectie fractie) in mindere mate daalt t.o.v. de wildtype dieren. Deze dieren zullen dus naar onze verwachting geen, of in mindere mate, hartfalen ontwikkelen met als gevolg ook verminderd ongerief. Of dit tot een vermindering van ernstig naar matig ongerief zal leiden is op voorhand moeilijk in te schatten.

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.

Aan het einde van de studie dienen de organen van de muis gebestudeerd te worden. Zo zullen wij onder andere kijken naar het hart op microscopisch niveau. Dit kan enkel als het dier getermineerd wordt aan het einde van de proef. Hiernaast is het niet ethisch om de dieren welke hartfalen hebben ontwikkeld langer dan nodig voor het experiment te laten overleven.

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.
- 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 het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Hartfalen als gevolg van myocarditis, muis

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.

Binnen deze bijlage zal hartfalen geïnduceerd worden middels de inductie van myocarditis. Er zijn twee internationaal geaccepteerde muismodellen voor myocarditis, die de twee verschillende klinische fases bij patiënten representeren: Viral Myocarditis (VM) (Fairweather & Rose, 2007. Methods.) en Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM) (Myers et al, 2013. Curr. Prot. Imm.). In VM wordt door injectie van Coxsackie Virus B3 (CVB3) een acute myocarditis geïnduceerd die binnen een week leidt tot hartfalen. Aangezien dit de eerste fase is waarin patiënten met myocarditis zich presenteren, kunnen in dit model therapieën worden getest die chronische myocarditis en het daaraan gerelateerde hartfalen kunnen worden voorkomen.

In het EAM model wordt een cardiac myosine peptide in de nekplooi geïnjecteerd, gecombineerd met Complete Freud's Adjuvans (CFA). Dit veroorzaakt een

langzamere, chronische vorm van myocarditis, die na ongeveer 3 weken hartfalen geeft. Dit correleert met de chronische fase van myocarditis bij mensen, die zich in deze fase presenteren met (milde) klachten van hartfalen. Dit model biedt de mogelijkheid om te onderzoeken of potentiële therapieën in een verder gevormd stadium van myocarditis effectief zijn. Met beide modellen bestaat reeds ervaring in het lab, daarnaast wordt er intensief samengewerkt met prof. Heymans, die de nationale expert op het gebied van myocarditis en gerelateerde muismodellen is.

In beide modellen wordt het hart aangevallen door het virus en/of het immuunsysteem en sterven er globaal door het hart vele hartspiercellen (cardiomyocyten). Dit leidt tot verdere ontsteking (inflammatie) met een nog sterkere immuunafweer tot gevolg, en leidt uiteindelijk tot fibrose, dilatatie van het hart en een globaal verminderde hartfunctie. Als primaire uitkomstvariabele zal gekeken worden naar eind-diastolisch volume van het hart, als klinische surrogaat marker voor de mate van hartfalen.

Deze studies zullen we in zowel wildtype muizen doen, alsook in (conditionele) genetisch gemodificeerde muizen waarin meer duidelijkheid verkregen kan worden over de potentiële therapeutische waarde van verschillende targets. Daarnaast zullen we ook chimere muizen gebruiken, waarin we het beenmerg van een wildtype muis in een bestraalde genetisch gemodificeerde muis transplanteren en vice versa, om te bepalen of het therapeutische target in/op de (inflammatoire) cellen uit het beenmerg zit.

Een eerste doeltherapie die we hier willen toepassen is stamcel therapie. Naast regeneratieve eigenschappen wordt er steeds meer bekend over de potente immuunsuppressieve eigenschappen van stamcellen (Soeder et al, Stem Cells Transl Med 2015 & Wang et al, Expert Rev Clin Immunol 2015). Onze hypothese is dan ook dat behandeling met stamcellen het ontstaan van auto-immuun myocarditis kan worden onderdrukt.

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.

De dieren zullen achtereenvolgens de volgende behandelingen ondergaan:

1. dag 0: baseline hartfunctie meting middels echo onder narcose, gevolgd door immunizatie subcutaan met coxsackie virus B3CVB3 (VM) of myosine/CFA
2. In geval van EAM: booster immunizatie in de nekplooï op dag 7
3. Interventie op dag verschillende tijdstippen.
4. Hartfunctie meting middels echo onder narcose op verschillende tijdstippen: over een periode van maximaal 12 weken worden de dieren 6-8 keer geëchoed.
5. Dieren worden wekelijks gewogen ivm mogelijk gewichtsverlies tgv hartfalen. Op indicatie kunnen de muizen vaker gewogen worden.
6. Bloedafnames via wangpunctie (of, indien onsuccesvol, staartsnede) op verschillende tijdstippen: over een periode van maximaal 12 weken wordt maximaal 6x bloed afgenomen.
7. Terminatie experiment op verschillende tijdstippen onder ip narcose; explantatie bloed en organen voor verdere labanalyse.

De verschillende tijdstippen van echografie, interventies, bloedafnames en terminatie zijn gebaseerd op moleculaire en cellulaire veranderingen:

2-7 dagen: Start van inflammatie (hevig in VM, opbouwend in EAM). De acute veranderingen in cardiale functie en veranderingen van immuuncel-types in het bloedprofiel kunnen geëvalueerd worden en tussen de groepen kunnen vergeleken worden.

14-28 dagen: De cardiale schade breidt langzaam uit door blijvende immuunactivatie terwijl het hart de eerste stadia van remodelering ondergaat. Door de achteruitgang in pompfunctie ontwikkelen de muizen hartfalen.

3 maanden: Om de effecten van een therapie op lange termijn te bestuderen zullen we een aantal dieren 3 maanden laten overleven.

In het geval van de chimeer experimenten zal aan bovengenoemd LAD ligatie protocol de volgende behandelingen voorafgaan:

1. Terminaal experiment: Het dier wordt middels een cervicale dislocatie getermineerd. Femur en humerus worden beiderzijds blootgelegd en beenmerg wordt geaspireerd.
2. Beenmerg transplantatie in de acceptoren (na rontgenbestraling; 7 Gy) middels intraveneuze (staart vene) injectie van donor beenmerg (5×10^6 cellen in 0.25 ml). Hierna volgt een periode van 6 weken herstel, waarin het beenmerg zich nestelt in de gast. Gedurende deze periode worden de dieren onder een filtertop gehouden, ter vermindering van infectiegevaar.
3. Wegen muizen op -6, -5 en -4 weken.
4. Toediening van water met ciprofloxacin twee dagen vóór bestraling tot 14 dagen na bestraling vanwege de tijdelijk verminderde weerstand.

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

De studie is gepowerd op de primaire uitkomstparameter ejectie fractie volume welke middels 3D echografie bepaald zal worden. De volgende statistische berekening is uitgevoerd om het aantal dieren tot een minimum te beperken:

Power: 90%, Alpha: 0,05, SD: 0.2mm³ (Corsten et al, Circ Res 2012), Gewenst effect: 35% toename ejectie fractie volume.

Dit geeft n=12 per groep (gecorrigeerd voor multiële vergelijkingen).

Uit ervaring van ons en andere labs is gebleken dat als gevolg van de procedure er een mortaliteit is van 20-25%. Dit geeft in totaal 15 dieren per groep.

Hiernaast zullen er 8 controle muizen per tijdstip (4 wildtype en 4 gemodificeerd) alsook 8 baseline terminaties per studie ingezet worden

B. De dieren

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

Diersoort: Muizen. In wildtype muizen zullen een placebo- en interventiegroep(en) vergeleken worden. Bij werk met genetisch gemodificeerde muizen zal een genetisch gemodificeerde muis vergeleken worden met een wildtype-muis van dezelfde strain. Het soort muis dat dan gebruikt zal worden is afhankelijk van het ras waarin de genetisch gemodificeerde muis is opgewekt. Wij zullen onder andere gaan werken met BALB/c, C3H en C57BL/6 muizen. Zowel mannelijke als vrouwelijke muizen zijn gevoelig voor het hier beschreven myocarditis model. Echter door de hormonale schommelingen in vrouwelijke dieren en de invloed daarvan op het immuunsysteem zullen voor deze experimenten bij voorkeur mannelijke dieren gebruikt worden.

Levenstadia: De dieren zullen worden opgenomen in het experiment bij een leeftijd van 8-12 weken.

Geschatte aantallen: Zoals hierboven beschreven zullen 15 dieren per groep nodig zijn en hiernaast 4 baseline dieren. Per werkprotocol zullen de dieren worden verdeeld over verschillende experimentele groepen:

1. baseline terminatie (n=4 (placebo vs interventie of wildtype vs genetisch gemodificeerd) = 8)
2. terminatie tijdstip 1 (n= $2 \times 15 + 8 = 38$)
3. terminatie tijdstip 2 (n= $2 \times 15 + 8 = 38$)
4. terminatie tijdstip 3 (n= $2 \times 15 + 8 = 38$)
5. terminatie tijdstip 4 (n= $2 \times 15 + 8 = 38$)

Totaal: 160 dieren Wildtype/placebo: 80 genetisch gemodificeerd/interventie: 80

In het geval van de chimeer experimenten zullen er 4 experimentele groepen zijn per tijdstip:

1. genetisch gemodificeerde muis + wildtype beenmerg (n=15)

2. wildtype muis + genetisch gemodificeerd beenmerg (n=15)
3. wildtype muis +wildtype beenmerg (n=15)
4. genetisch gemodificeerde muis + genetisch gemodificeerd beenmerg (n=15)
+ dieren voor het verkrijgen van beenmerg: 5x2=10
Totaal: 70 dieren wildtype: 35 knock-out: 35

Zoals in het projectvoorstel genoemd zullen wij verschillende mogelijke mechanismen en interventies testen. In het eerste werkprotocol hebben wij beschreven dat om een doelwit goed te bestuderen het in de praktijk nodig is dat gekeken wordt naar knock-out muizen, muizen die het gen tot overexpressie brengen en farmacologische inhibitie/stimulatie van het desbetreffende doelwit. Ook is het belangrijk om hiernaast chimeer experimenten uit te voeren om het verschil tussen circulerende cellen uit het beenmerg en de cellen in het hart aan te tonen. Om de gevonden resultaten te valideren is het tegenwoordig een vereiste dat de experimenten minimaal eenmaal herhaald worden.

Dit geeft per doelwit: 160 muizen x 3 (studieopzet) x 2 (validatie) + 70 x 2 (chimeren) = 1100 dieren

Op basis van de frequentie van dit onderzoek de afgelopen jaren wordt verwacht dat dit protocol maximaal drie keer zal worden uitgevoerd binnen ons gehele lab over een periode van 5 jaar. Dit geeft een totaal van maximaal 3300 dieren.

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: Bij het opzetten van deze studie is uitvoerig in vitro voorwerk gedaan en zijn patientenweefsels en -gegevens bestudeerd. Echter, zowel hartfalen is een complex ziektebeeld waarbij meerdere weefsels, celtypes, paracrine factoren en mechanismen een rol spelen. Dit geheel is in vitro lastig na te bootsen. Elke interventie die wij in deze muizen willen testen is eerst uitvoerig getest in in vitro systemen met humane (of patienten) immuuncellen in het laboratorium. Helaas is het nu noodzakelijk om levende dieren te gebruiken om de rol van het verscheidene inflammatoire en fibrotische processen in het ziektebeeld hartfalen als geheel te kunnen bestuderen.

Vermindering: Zoals genoemd zijn eerst uitvoerig de mogelijke therapeutische doelwitten gebestudeerd in de literatuur en het laboratorium, bijvoorbeeld in een kweekschaal. Dit voorkomt dat er onnodige dierexperimenten uitgevoerd worden. Er zal alleen overgegaan worden op een dierexperiment als een doelwit

potentieel therapeutische mogelijkheden oplevert.

Verfijning: Muizen worden in een groep gehuisvest, inclusief kooiverrijking. In de opzet van de studies hebben wij gepoogd het aantal handelingen te minimaliseren en zoveel mogelijk te laten samenvallen met echo, zodat ze onder verdoving kunnen plaatsvinden.

Complete Freud's Adjuvans:

Aangezien er altijd vraag zijn mbt het gebruik van Complete Freud Adjuvans (CFA) in het Experimentele Auto-immuun Myocarditis model, zouden wij graag uitleggen waarom het gebruik hiervan in onze ogen essentieel is. CFA bestaat uit dode mycobacterium tuberculosis. Door het inspuiten hiervan worden monocytën en macrofagen aangetrokken, die vervolgens het peptide gaan presenteren dat met de CFA is ingespoten. Hierdoor ontstaat de auto-immuun reactie die nodig is voor het myocarditis model. Dit model wordt wereldwijd al vele jaren gebruikt en de correlatie met patienten met myocarditis is dan ook goed onderzocht.

Dat CFA een erg sterke immuun respons geeft is bekend en is ook nodig om dit model succesvol te laten verlopen. Een minder heftig middel leidt tot een minder intense immuunreactie en als gevolg tot een mildere myocarditis. Gezien de verwachte effectiviteit, zou de groepsgrootte dan flink moeten vergroten om duidelijke (significante) resultaten te zien. Daarbij is van het CFA model bekend dat dit leidt tot een vergelijkbare eindsituatie als we bij mensen zien. Dit is niet bekend bij het gebruik van andere, mildere adjuvantia. Deze vergelijking zou in dat geval aanvullend moeten plaatsvinden om het nieuwe model klinisch relevant te maken. In onze ervaring met een CFA injectie in de nekplooi zien we dat de muizen niet afvallen, normaal gedrag vertonen en goede mobiliteit. Rondom de injectie-site in de nekplooi zaten geen necrose plekken en ook de vachtconditie bleef goed.

Aangezien wereldwijd CFA gebruikt wordt, geeft dat een goede vergelijkbaarheid met interventies in het EAM model in andere muizenstudies. Door nu als enige met een ander adjuvans te gaan werken, zouden we eerst een pilot studie met titratie moeten doen en de stadiering van myocarditis op verschillende tijdstippen moeten vergelijken met het huidige standaard model met CFA om dit model zo dicht mogelijk te benaderen. Dit kost meer muizenlevens en de vergelijkbaarheid zal voor andere myocarditis-onderzoekers discutabel blijven.

Dit alles in overweging nemende, en na uitvoerige discussie binnen de groep, kiezen wij bewust voor hoger ongerief bij de muizen in deze studie door gebruik van CFA. De validiteit is dan veel sterker en er zijn minder muizenlevens nodig dan wanneer wij voor een ander adjuvans kiezen met alle bijbehorende onzekerheden.

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 muizen zullen in groepen gehuisvest worden wat angst zal verminderen.

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.

Is lab zijn wij zeer actief in het onderzoek naar hartfalen. Hierdoor zijn wij goed op de hoogte van de literatuur binnen dit vakgebied. Wij zullen enkel studies uitvoeren waarvan op basis van gedegen literatuur onderzoek blijkt dat eenzelfde dierproef niet eerder is uitgevoerd.

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?

Kortademigheid, gewichtsverlies en cyanose.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Door inductie van myocarditis zal de hartfunctie van de muizen langzaam achteruit gaan, hetgeen uiteindelijk zal resulteren in hartfalen. De symptomen hiervan betreffen kortademigheid (tgv longoedeem), gewichtsverlies en in sommige gevallen tot cyanose.

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

Het voorkomen van deze schadelijke effecten binnen de proef is niet mogelijk aangezien het noodzakelijk is voor het experiment dat de dieren hartfalen ontwikkelen. Wel zullen wij de dieren nauwkeurig monitoren, frequent gewichtscontroles uitvoeren en zoals hieronder beschreven een duidelijk humaan eindpunt omschrijven.

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.

Dieren uit proef genomen bij 20% gewichtsverlies tijdens de gehele duur van het experiment t.o.v. individueel gewicht kort voor inductie (dag 0). Weegmomenten zullen plaatsvinden direct voor of aansluitend op de echometingen. Op indicatie van vermagering/gewichtsverlies, te zien door zichtbaarheid van ribben/ruggengraat, zal een extra weegmoment opgenomen worden. Ook bij sterk verminderde activiteit/mobiliteit zal worden besloten tot voortijdige euthanasie om het ongerief zo veel mogelijk te beperken

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

Alle dieren welke myocarditis hebben lopen de kans op hartfalen en hierdoor gewichtsverlies. Het percentage wat dit humane eindpunt zal bereiken is naar onze ervaring maximaal 10%.

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.

5% van de dieren wordt op baseline getermineerd. Dit ongerief wordt ingeschat op: matig.

95% van de dieren zal myocarditis ontwikkelen en hierdoor hartfalen, dit ongerief is: ernstig. de helft van deze dieren (47.5% van het totaal) zal ofwel een behandeling ondergaan of zodanig genetisch gemodificeerd zijn dat onze verwachting is dat na het induceren van myocarditis de hartfunctie (ejectie fractie) in mindere mate daalt t.o.v. de wildtype dieren. Deze dieren zullen dus naar onze verwachting niet, of in mindere mate, hartfalen ontwikkelen. Dit zou tot een vermindering van ernstig naar matig ongerief kunnen leiden.

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.

Aan het einde van de studie dienen de organen van de muis gebestudeerd te worden. Zo zullen wij onder andere kijken naar het hart, milt en bloed op

microscopisch/cellular niveau. Dit kan enkel als het dier getermineerd wordt aan het einde van de proef. Hiernaast is het niet ethisch om de dieren welke hartfalen hebben ontwikkeld langer dan nodig voor het experiment te laten overleven.

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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11532	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universitair Medisch Centrum Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		4	Varkensmodel voor ischemisch hartfalen

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.

Hartinfarcten en de gevolgen daarvan op de ziektelast en sterfte in de gehele wereld nemen een belangrijke plaats in. Een hartinfarct ontstaat als een kransslagader, die de hartspier van zuurstofrijk bloed en voedingsstoffen voorziet, afgesloten raakt door bijv. een stolsel. Dit leidt tot zuurstoftekort in de achterliggende spiercellen, die daardoor kunnen afsterven. Wanneer er minder spiercellen zijn om te pompen, zal dus ook de pompfunctie van het hart minder worden en hartfalen kunnen optreden. Om deze schade aan de hartspier zoveel mogelijk te beperken, wordt een kransslagader die plotseling afgesloten is geraakt en leidt tot een hartinfarct, zo snel mogelijk weer open gemaakt (gedotterd). Deze therapie heeft het voordeel dat de hartspier weer voldoende zuurstof en voedingsstoffen ontvangt. Het is echter uit onderzoek gebleken dat de plotselinge toestroom van zuurstof en het feit dat een deel van

de hartspeer een tijd zonder zuurstof heeft gezeten, tot een ontstekingsreactie kan leiden. Deze ontstekingsreactie - ook wel ischemie/reperfusie schade genoemd - veroorzaakt forse schade ook nadat de bloedstroom naar het deel van de hartspeer dat zonder bloed zat is hersteld.

1 dag voor iedere operatie (toebrengen hartinfarct en terminatie) wordt een pleister met pijnstilling op de buik aangebracht die gedurende de gehele week daarna werkzame stof zal afgeven. Operaties worden uitgevoerd onder algehele anesthesie: als premedicatie wordt intramuscular een mix van ketamine, midazolam en atropine gegeven. Hierna volgt inductie m.b.v. intraveneuze toediening van barbituraat. Onderhoudsanesthesie bestaat uit intraveneuze toediening van een spierverslapper (zoals pancuronium), slaapmiddel (midazolam) en pijnstilling (sufentanil). Varkens worden gedurende de gehele operatie beademd met een mix van lucht en zuurstof (2:1).

Inductie van het hartinfarct wordt bewerkstelligd door via de hals een ballon in de kransslagader te brengen en deze op te blazen. Afhankelijk van de opzet van het experiment zullen we de ballon na 75, 90, 180 minuten leeg laten lopen om de bloedstroom te herstellen. Op deze manier bootsen we de ischemie-reperfusie-schade zoals die bij patiënten optreedt op een zo goed mogelijke manier na. Deze proefopzet is algemeen geaccepteerd (McCall et al. Nature protocols (2012)) en veelvuldig verricht door onze eigen groep (Koudstaal et al. JoVE (2014); De Jong et al. Circ cardiovasc interv (2014); De Jong et al. Jong biomed research international (2014)).

Vóór ischemie zullen we echo en druk-volume metingen verrichten en bloed afnemen. Na reperfusie zullen we op verschillende tijdstippen bloed afnemen om het effect op de circulerende cellen te meten. Dat zullen we pijnloos en snel kunnen doen de plaatsing van een centraalveneuze lijn (jugulariscatheter) na onderwerping aan een hartinfarct. In enkele studies zullen we voor ischemie een MRI maken om een referentie van de gezonde hartfunctie te hebben. Eventueel zullen we bij een specifiek experiment beenmergbiopsies afnemen als het dier onder narcose is (bijv. tijdens de operatie van hartinfarct of bij terminatie). In studies waarin we onderzoek doen naar nieuwe technieken om de therapie uit te voeren via bijvoorbeeld beeld gestuurde interventies zullen we vóór de therapie een MRI maken om o.a. het infarctgebied te visualiseren. Vóór terminatie zullen we opnieuw echo en druk-volume metingen verrichten. Direct na terminatie zal het hart ugenomen worden voor kwantificering van de infarctgrootte en voor de opslag en verwerking van weefsel. Primaire uitkomstparameter zal infarctgrootte zijn bij de follow-up van dieren die een korte follow-up duur hebben (terminatie dezelfde dag, na 3 of na 7 dagen) en linker ventriculaire ejectiefractie (LVEF) bij langer durende follow-up (terminatie na 4, 6 of 8 weken). Daarnaast zullen studies met twee of meer groepen worden gedaan om de nauwkeurigheid van verschillende beeld gestuurde therapieën te onderzoeken. De primaire uitkomst hierbij is de afstand tot een vooraf gedefinieerd doelgebied en wordt bepaald met imaging of histologie.

Een doeleiwit om hartfunctie na ischemie te verbeteren is EDA fibronectine. Het EDA domein van fibronectine komt alleen tot expressie onder pathologische processen en is sterk verhoogd aanwezig in het hart na een hartinfarct. In het verleden hebben we al aangetoond dat EDA-fibronectine een belangrijke rol speelt in ongunstige remodelering van het hart na ischemie in de muis (Arslan et al. Circ. Res. 2011). In het varken zullen we de potentie van een EDA-fibronectine blokkerend antilichaam gaan testen.

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.

1. Baseline echometing of MRI
2. Halsincisie, waarbij toegang verkrijgen tot de a. carotis / v. jugularis, waarna invasieve druk-volumemetingen
3. Toebrengen hartinfarct door opvoeren en opblazen ballon in de kransslagader
4. Aanbrengen centraalveneuze (lange) lijn in de v. jugularis, tunnelen naar de rug
5. Meerdere malen bloedafnames tijdens operatie en in de weken daarna uit de centraalveneuze lijn (geen ongerief)

6. Terminatie:

- MRI om beeld gestuurde therapieën te onderzoeken
- op dezelfde dag, 3 dagen of 7 dagen nadien: nodig voor kwantificeren van de infarctgrootte en het bepalen van cellulaire en biologische processen die direct met de reperfusieschade te maken hebben (rol van ontstekingscellen)
- 4, 6, 8 of 12 weken nadien om het effect te bepalen op het remodeleren van het hart (functioneel herstel) nadat het is veranderd door fibrosering en verbindweefseling

7. Wekelijks wegen van het varken

8. Dagelijks flushen lange lijn

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

Om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken proberen we uit ieder dier zoveel mogelijk informatie te vergaren. Dat betekent dat we zowel functionele metingen (echo, druk-volume metingen) als structurele uitkomsten meenemen (weefsel, bloed, etcera). We hebben goed contact met andere afdelingen die ook onderzoek doen naar de reactie van het immuunsysteem op forse schade en die soms weefsel (milt, lever, nieren, bloed) gebruiken van dezelfde varkens. We zullen naar de literatuur kijken en alleen therapieën testen waar we redelijkerwijs een goed effect van verwachten.

Qua statistiek kiezen we ervoor om varkens direct met elkaar te vergelijken en uit te gaan van gewenste effecten die klinisch relevant zijn en haalbaar. Daarnaast kijken we naar variatie zoals we ook eerder hebben gezien in ons dierenlaboratorium. We proberen om goed te poweren, want te weinig power levert uiteindelijk het nutteloos gebruik van dieren op, omdat je het effect niet eens zou hebben kunnen detecteren. Teveel dieren is onnodig en daarmee onwenselijk.

B. De dieren

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

We zullen gebruik maken van landvarkens vanwege het feit dat deze dieren qua anatomie en (patho)fysiologie het meest op de mens gelijken. Ook qua immuunsysteem en metabolisme lijken varkens erg veel op mensen. Het geslacht van de dieren maakt voor de onderzoeksvraagstelling niet uit, echter wordt de voorkeur gegeven aan vrouwelijke dieren vanwege agressief gedrag dat mannelijke varkens vertonen. Daarnaast zijn vrouwelijke varkens een stuk lichter wat het hanteren van de dieren ten goede komt. De landvarkens komen bij Van Beek (Lelystad) vandaan. Dit is een regulier vleesvarken bedrijf wat ook dieren levert voor onderzoek. Hiervoor kiezen we omdat we goede ervaring met deze diersoorten hebben en qua methodologie op eerdere experimenten willen voortbouwen. Varkens zijn circa enkele maanden oud en niet zwaarder dan 100 kilogram, gezien het feit dat ze dan niet meer goed als proefdieren te hanteren zijn.

Omdat de meeste therapieën met effect op ischemie-reperfusie schade ook een betere hartfunctie kunnen opleveren, zullen we over het algemeen binnen ieder experiment met 2 groepen werken: een korte en een lange follow-up. Daarnaast zullen studies met twee of meer groepen worden gedaan om de nauwkeurigheid van verschillende technieken om therapie uit te voeren met elkaar te vergelijken.

Korte follow-up: gepowered op infarct size (IS) t.o.v. area at risk (AAR). IS / AAR is normaliter circa 80% en met de therapie willen we dit te reduceren naar minimaal 70%. Met een alpha van 0.05, een power van 0.9 en een SD van 11% (gebaseerd op recente resultaten binnen ons lab) komen we uit op 13 dieren per groep. Met een uitval van 20% (gebaseerd op eerdere varkensexperimenten) komen we uit op 16 dieren, 32 in totaal. Hieraan willen we nog een derde van deze groep negatieve controles (shams) toevoegen; 10 dieren (5 vs. 5) zonder uitval, vanwege het feit dat zij geen hartinfarct zullen krijgen.

Lange follow-up: gepowered op linker ventrikel ejectiefractie (LVEF), normaliter na infarct circa 40%. In vergelijking met andere dierexperimentele studies vinden we een effect van 8% relevant (normaliter rond de 5%). We gaan uit van een SD van 9% (zoals gezien door Ishikawa et al. (2014) AJP Heart Circ Physiol en resultaten binnen ons lab). Met een alpha van 0.05 en een power van 0.9 komen we uit op 14 dieren per groep. Met een uitval van 20% (gebaseerd op eerdere varkensexperimenten) komt dat neer op 17 dieren per groep, 34 in totaal. Een derde van deze groep is sham; 12 dieren (6 vs. 6).

Uitgaande van het aantal volledige experimenten per jaar de afgelopen 5 jaren, gaan we hier uit van 2 dierexperimenten per jaar, 5 jaar in totaal. Daarmee komen we uit op 880 dieren in totaal:

- korte follow-up: $(32+10)*5*2 = 420$
- langdurige follow-up: $(34+12)*5*2 = 460$

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.

Dit experiment kan niet zonder proefdieren worden uitgevoerd omdat het ontstaan van een hartinfarct een erg complex proces is dat niet met computermodellen of anderszins kan worden nagebootst. Wanneer bijvoorbeeld gekeken wordt naar de regeneratie van het hartspierweefsel, zijn hier verschillende celtypen bij betrokken (ontstekingscellen, hartcellen, fibroblasten), die allemaal met elkaar reageren. Na een hartinfarct zullen cellen bepaalde signalen uitzenden, waardoor bepaalde celtypen zullen worden aangetrokken of afgestoten, geactiveerd of onderdrukt. Deze cross-talk, signalen en reacties van alle verschillende celtypen zijn zo uitgebreid, complex en in samenhang dat deze niet in een model samen te vatten zijn.

Bij het testen van een nieuwe therapie is het daarnaast nodig om te evalueren wat het effect hiervan is in een op de mens gelijkend model. Voordat je het in de mens test, wil je in ieder geval weten of het geen slecht effect op de hartspier heeft. Daar zal ook naar gekeken worden in een klein proefdiermodel, maar dat wil niet gelijk zeggen dat het ook zo is in een groot, op de mens gelijkend, model. Daarnaast is het nodig om invasieve metingen te doen (druk-volume curves) en uitgebreid weefselonderzoek te doen, wat uitname van hart-, maar ook bijvoorbeeld milt-, lever en longweefsel tot een vereiste maakt.

Door de gebruikte statistische methodes, een groot aantal functionele metingen en het gebruik van meerdere weefsels zal het aantal dieren tot een minimum

beperkt worden. Daarnaast maken we gebruik van zeer ervaren personeel, die ervoor zorgen dat de experimenten weinig complicaties kennen en goed uitgevoerd zullen worden. De toegepaste operatietechnieken worden regelmatig uitgevoerd (en zonodig getraind op 3 varkens) om de bekwaamheid te onderhouden. Waar mogelijk zullen we potentiële targets eerst testen in vitro of in muismodellen. Vóór de start van de dierproef wordt een uitvoerige literatuurstudie gedaan op gelijksoortige proeven; dit zal de voornaamste check-up zijn. Daarnaast wordt de proef van tevoren besproken met onderzoekers en leidinggevers die veel ervaring hebben op dit gebied van onderzoek en mogelijk al op de hoogte zijn van gedane experimenten en proeven.

Vanwege het closed-chest model (minimaal invasief ballon opvoeren), zullen de operatiewonden beperkt worden. Een goede verzorging en pijnstilling zal het ongerief verder reduceren.

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.

Dieren zullen pijnstilling krijgen, goed verzorgd worden en klinisch gevolgd worden. Bij ernstige klachten of het bereiken van het humane eindpunt zal het dier uit zijn lijden verlost worden. Angst zal worden beperkt door een vast en klein aantal diervverzorgers die goed met de dieren omgaan en hen de verzorging en het onderhoud (eten, drinken) geven die ze nodig hebben. De kooien zijn verrijkt en varkens kunnen elkaar horen en ruiken.

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.

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.

Vóór de experimenten zullen de dieren in groepen worden gehuisvest. Vanaf de eerste operatie zal het dier solitair gehuisvest worden i.v.m. medicatietoediening en ter preventie van onnodige stress. Ook vanwege de bloedsampling catheters zal individuele huisvesting met volledige afscherming noodzakelijk zijn. Anders kunnen ze bij elkaar aan de catheters wroeten en eventueel schade hieraan toebrengen, waardoor we geen goede bloedafname kunnen bewerkstelligen en het experiment daarmee zou kunnen falen. Om het contact met andere varkens onder deze omstandigheden nog enigszins te onderhouden, zullen ze in dezelfde ruimte ondergebracht worden waar ze andere varkens wel nog kunnen horen, ruiken en zien.

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?

Dieren zullen mogelijk kortademiq worden en tekenen van hartfalen (oedeemvorming, cyanose) vertonen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het hartinfarct zoals eerder beschreven.

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

Een goede definitie van het humane eindpunt moet voorkomen dat de schadelijke effecten disproportioneel groot worden en tot onverdraagzaam lijden leiden. Conventionele medicijnen zullen teveel interfereren met de studiemedicatie, dus dat zal niet mogelijk zijn. Eventueel zal pijnstilling gegeven worden en zal het het varken zo comfortabel mogelijk (eten, goede houding) gemaakt worden.

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.

Geen voedsel/vocht inname. Persisterende dyspnoe, tachypnoe, perifere cyanose, immobiliteit langer dan 36 uur postoperatief. Zichtbare pijn ondanks pijnbestrijding. De eerste 3 dagen na OK zal dagelijks door de onderzoeker of (bij afwezigheid van de onderzoeker) iemand anders van de experimentele cardiologie het dier beoordeeld worden.

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

5%.

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.

Ernstig voor de dieren die aan een hartinfarct worden onderworpen (75% van de dieren).

Matig voor de dieren die een sham-operatie zullen ondergaan (25% van de dieren).

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.

Vanwege het feit dat het nodig is om weefsel van het hart te verkrijgen voor infarctgrootte bepaling en voor opslag in de vriezer (histologie).

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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11532	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universitair Medisch Centrum Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		5	Varkensmodel voor hartfalen ten gevolge van drukoverbelasting

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.

Hartfalen kan grosso modo onderverdeeld worden in twee groepen: hartfalen met een verminderde pompfunctie (zoals na een hartinfarct) en hartfalen met redelijk behouden pompfunctie (heart failure with preserved ejection fraction, HFPEF, vroeger diastolisch hartfalen). Circa de helft van alle mensen met hartfalen heeft deze laatste vorm (HFPEF), waarbij het hart verbindweefsel is en zich daardoor o.a. niet meer goed kan ontspannen en niet goed kan vullen. Deze vorm van hartfalen wordt voornamelijk veroorzaakt door bloeddrukverhoging (hypertensie) en suikerziekte (diabetes). Naast het feit dat HFPEF de meest voorkomende vorm van hartfalen is, is het minstens zo belangrijk om te weten dat de onderliggende biologische processen grotendeels onbekend zijn. I.t.t. bij hartfalen na een hartinfarct bestaat er bij HFPEF nog geen enkele therapie die een positief effect op de ziekte heeft. Om de biologische processen

verder te onderzoeken en om daarop gerichte therapieën te testen, is het nodig om een groot proefdiermodel voor HFPEF te gebruiken. De bestaande kleine proefdiermodellen voor drukoverbelasting leiden na een eerste periode van linker ventrikelhypertrofie uiteindelijk tot een gedilateerd hart dat leidt tot ernstig hartfalen met verminderde ejectiefractie. Dit model schiet tekort om het met de mens te vergelijken, aangezien de mens een permanente linker ventrikelhypertrofie en verbindweefseling laat zien, zonder dilatatie en met behouden ejectiefractie. Daarnaast speelt de immunologie een grote rol bij HFPEF, een systeem dat in het varken veel grotere gelijkenis vertoont met de mens dan in kleinere proefdiermodellen.

Om de drukoverbelasting van het hart na te bootsen, brengen we op dag 0 een band om de aorta aan die via een kabel naar de rug loopt. Deze kan handmatig op de rug bijgesteld worden, zodat betrouwbare drukken aangebracht en gevarieerd kunnen worden. Met oplopende drukken kunnen we de druk waar het hart tegenin moet pompen in de loop van de weken opvoeren, wat een uitgesproken verbindweefseling van het hart zal laten zien en de mogelijkheid geeft voor het hart tot aanpassen, conform ook bij mensen en hypertensie.

Dieren zullen een centraalvene lijn krijgen geïmplantéerd tijdens de eerste operatie om streptozotomycine door toe te dienen om zo suikerziekte te induceren. Met behulp van bloedafnames zullen we de bloedsuikers en de ernst kunnen vervolgen. Deze methode en operatie om een diastolische dysfunctie en hartfalen met behouden ejectiefractie te verkrijgen staat beschreven (Falcao et al. Basic res cardiol (2011); Yarbrough et al. J thorac cardiovasc surg (2012) en wordt momenteel toegepast in ons dierenlaboratorium. Het lab van de experimentele cardiologie heeft uitgebreide ervaring met verschillende varkensoperaties (Koudstaal et al. JoVE (2014); De Jong et al. Circ cardiovasc interv (2014); Stecher et al. J thorac cardiovasc surg (2014); Grundeman et al. Interact cardiovasc thorac surg (2012)

1 dag voor iedere operatie (aanbrengen peri-aortale cuff en terminatie) wordt een fentanylpleister (opioïde, analgeticum) op de buik aangebracht die gedurende de gehele week daarna werkzame stof zal afgeven. Operaties worden uitgevoerd onder algehele anesthesie: als premedicatie worden intramuscular ketamine (NMDA receptor antagonist, dissociatief sedativum), midazolam (benzodiazepine, onderdrukking van het centraal zenuwstelsel) en atropine (anticholinergicum, bronchodilatatie) gegeven. Hierna volgt inductie m.b.v. intraveneuze toediening van natrium thiopenthal (barbituraat, onderdrukking van het centraal zenuwstelsel). Onderhoudsanesthesie bestaat uit intraveneuze toediening van pancuronium (spierverlapper), midazolam en sufentanil (opioïd, analgeticum). Het varken wordt gedurende de gehele operatie beademd met een mix van lucht en zuurstof (2:1).

Het handmatig aandraaien van de peri-aortale cuff zal 4x worden verricht gedurende de periode van 9 weken. Premedicatie (intramusculaire toediening van ketamine, midazolam, atropine) zal worden gebruikt om het varken te sederen en het tuigje en device veilig los te maken zonder dat hieraan wordt getrokken.

Op deze manier hebben we zowel hoge bloeddruk als suikerziekte in het model ingebouwd, wat de twee ernstigste en meest voorkomende factoren zijn waarom HFPEF ontstaat. We zullen 9 weken na de eerste operatie het varken termineren, omdat we daarbij voldoende verbindweefseling verwachten om

De primaire uitkomstparameter zullen dimensies van diastolische dysfunctie zijn zoals gemeten met echo (einddiastolisch volume).

Een doeleiwit om hartfunctie na ischemie te verbeteren is EDA fibronectine. Het EDA domein van fibronectine komt alleen tot expressie onder pathologische processen en is sterk verhoogd aanwezig in het hart na een hartinfarct. In het verleden hebben we al aangetoond dat EDA-fibronectine een belangrijke rol speelt in ongunstige remodelering van het hart na ischemie in de muis. In diastolisch hartfalen is de aanwezigheid van EDA-fibronectine in het hart ook sterk verhoogd (eigen ongepubliceerde data) In het varken zullen we de potentie van een EDA-fibronectine blokkerend antilichaam op het ontstaan en de progressie van diastolisch hartfalen gaan testen.

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.

1. Baseline echometing onder anesthesie
2. Halsincisie, waarbij toegang verkrijgen tot de a. carotis / v. jugularis, waarna invasieve druk-volumemetingen
3. Thoracotomie, waarna aanbrengen bandje om de aorta ascendens en tunnels naar de rug
4. Aanbrengen centraalveneuze lijn in de v. jugularis, tunnels naar de rug
5. 7 dagen na aanbrengen bandje inductie diabetes door 3 opeenvolgende dagen via lange lijn infusie van streptozotomycine, geeft misselijkheid
6. op dag 14, 28, 42 en 56 varken onder lichte anesthesie voor aandraaien bandje om aorta, op indicatie gelijk longfoto en echometing
7. Meerdere malen bloedafnames tijdens operatie en de weken erna uit de centraalveneuze lijn (geen ongerief)
8. Terminatie 9 weken na de eerste operatie, waarbij onder anesthesie echo, druk-volumemetingen, bloedafname en explantatie van het hart
9. Wekelijks wegen van het varken
10. Dagelijks flushen van de lange lijn (geen ongerief)

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

Om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken proberen we uit ieder dier zoveel mogelijk informatie te vergaren. Dat betekent dat we zowel functionele metingen (echo, druk-volume metingen) als structurele uitkomsten meenemen (weefsel, bloed, etcera). We hebben goed contact met andere afdelingen die ook onderzoek doen naar de reactie van het immuunsysteem op forse schade en die soms weefsel (milt, lever, nieren, bloed) gebruiken van dezelfde varkens. We zullen goed naar de literatuur kijken en alleen therapieën waar we redelijkerwijs een goed effect van verwachten, testen. Qua statistiek kiezen we ervoor om varkens direct met elkaar te vergelijken en uit te gaan van gewenste effecten die klinisch relevant zijn en haalbaar. Daarnaast kijken we naar variatie zoals we ook eerder hebben gezien in ons dierenlaboratorium. We proberen om goed te poweren, want te weinig power levert uiteindelijk het nutteloos gebruik van dieren op, omdat je het effect niet eens zou hebben kunnen detecteren. Teveel dieren is onnodig en daarmee onwenselijk.

B. De dieren

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

We zullen gebruik maken van landvarkens vanwege het feit dat deze dieren qua anatomie en (patho)fysiologie het meest op de mens gelijken. Ook qua immuunsysteem en metabolisme lijken varkens erg veel op mensen. Het geslacht van de dieren maakt voor de onderzoeksvraagstelling niet uit, echter wordt de voorkeur gegeven aan vrouwelijke dieren vanwege agressief gedrag dat mannelijke varkens vertonen. Daarnaast zijn vrouwelijke varkens een stuk lichter wat het hanteren van de dieren ten goede komt. De landvarkens komen bij Van Beek (Lelystad) vandaan. Dit is een regulier vleesvarken bedrijf wat ook dieren levert voor onderzoek. Hiervoor kiezen we omdat we goede ervaring met deze diersoorten hebben en qua methodologie op eerdere experimenten willen voortbouwen. Varkens zijn circa enkele maanden oud en niet zwaarder dan 100 kilogram, gezien het feit dat ze dan niet meer goed als proefdieren te hanteren zijn.

Qua aantallen gaan we uit van 2 dierstudies per jaar.

We gaan uit van een power van 0.9, een alpha van 0.05, relevant effect een afname van einddiastolische druk van 18mmHg naar 12mmHg (Yarbrough et al. J of thoracic and cardiovascular surgery (2012)), variatie van circa 30%. Met een uitval van 25% komen we uit op 12 dieren per groep, 24 in totaal.

Eenderde van dit aantal zal meegenomen worden als sham (niet plaatsen van het bandje), komt neer op 8 dieren (4 vs. 4).

In totaal komen we daarmee uit op $(24+8)*2*5 = 320$ varkens voor 5 jaar.

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.

Dit experiment kan niet zonder proefdieren worden uitgevoerd omdat het ontstaan van een HFPEF een erg complex proces is dat niet met computermodellen of anderszins kan worden nagebootst. Het ontstaan van fibrose en diastolische dysfunctie van het hart is afhankelijk van verschillende soorten celtypen. We denken momenteel dat voornamelijk cardiomyocyten, fibroblasten en inflammatoire cellen hierbij een grote rol spelen. Hoe deze echter uiteindelijk tot HFPEF leiden is niet helemaal bekend. Juist om deze interacties in kaart te brengen is een levend proefdiermodel nodig. Ook de effecten van therapieën op deze cross-talk, signalen en reacties van alle verschillende celtypen zijn zo uitgebreid, complex en in samenhang dat deze niet in een computermodel samen te vatten zijn. Omdat de anatomie, fysiologie en immunologie van het varken het meest op de mens gelijken, wordt bij uitstek dit model gebruikt.

Bij het testen van een nieuwe therapie is het daarnaast nodig om te evalueren wat het effect hiervan is in een op de mens gelijkend model. Voordat je het in de mens test, wil je in ieder geval weten of het geen slecht effect op de hartspeer heeft. Daar zal ook naar gekeken worden in een klein proefdiermodel, maar dat wil niet gelijk zeggen dat het ook zo is in een groot, op de mens gelijkend, model. Daarnaast is het nodig om invasieve metingen te doen (druk-volume curves) en uitgebreid weefselonderzoek te doen, wat uitname van hart-, maar ook bijvoorbeeld milt-, lever en longweefsel tot een vereiste maakt.

Door de gebruikte statistische methodes, een groot aantal functionele metingen en het gebruik van meerdere weefsels zal het aantal dieren tot een minimum beperkt worden. Daarnaast maken we gebruik van zeer ervaren personeel, die ervoor zorgen dat de experimenten weinig complicaties kennen en goed uitgevoerd zullen worden. Een goede verzorging en pijnstilling zal het ongerief zoveel mogelijk reduceren.

Vóór de start van de dierproef wordt een uitvoerige literatuurstudie gedaan op gelijksoortige proeven; dit zal de voornaamste check-up zijn. Daarnaast wordt de proef van tevoren besproken met onderzoekers en leidinggevendenden die veel ervaring hebben op dit gebied van onderzoek en mogelijkerwijs al op de hoogte zijn van gedane experimenten en proeven.

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.

Dieren zullen goede pijnstilling krijgen, zullen goed verzorgd worden en klinisch goed gevolgd worden. Bij ernstige klachten of het bereiken van het humane eindpunt zal het dier uit zijn lijden verlost worden. Angst zal worden beperkt door een vast en klein aantal diervverzorgers die goed met de dieren omgaan en hen de verzorging en het onderhoud (eten, drinken) geven die ze nodig hebben.

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.

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.

De dieren zullen in groepen worden gehuisvest tot 7 dagen vóór de eerste operatie. Dan krijgen ze een tuigje om waarbij ze al kunnen wennen. In de eerste operatie worden het bandje om de aorta met aandraaidevice op de rug en de bloedsampling catheter aangebracht. Deze zijn essentieel voor het slagen van het experiment. Om te voorkomen dat met deze catheters door andere dieren wordt geknoeid, zullen de dieren ook later individueel gehuisvest blijven. Om het contact met andere varkens onder deze omstandigheden nog enigszins te onderhouden, zullen ze in dezelfde ruimte ondergebracht worden waar ze andere varkens wel nog kunnen horen, ruiken en zien.

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?

Dieren zullen mogelijk kortademiig worden en tekenen van hartfalen (oedeemvorming, cyanose) vertonen. Daarnaast kan type I suikerziekte ontstaan wanneer het varken erg hevig reageert op de streptozotomycine.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Hartfalen ten gevolge van de verbindweefseling van het hart door drukoverbelasting en suikerziekte. Inductie van suikerziekte door streptozotomycine.

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

Een goede definitie van het humane eindpunt moet voorkomen dat de schadelijke effecten disproportioneel groot worden en tot onverdraagzaam lijden leiden. Conventionele medicijnen tegen hartfalen zullen teveel interfereren met de studiemedicatie, dus dat zal niet mogelijk zijn. Eventueel zal pijnstilling gegeven worden en zal het het varken zo comfortabel mogelijk (eten, goede houding) gemaakt worden.

Bij varkens met type I suikerziekte zullen we insuline spuiten om deze onder controle te houden, dat zal de misselijkheid en de insulinebehoefte oplossen.

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.

Geen voedsel/vocht inname. Persisterende dyspnoe, tachypnoe, perifere cyanose, immobiliteit langer dan 36 uur postoperatief. Zichtbare pijn ondanks pijnbestrijding. De eerste 3 dagen na OK zal dagelijks door de onderzoeker of (bij afwezigheid van de onderzoeker) iemand anders van de experimentele cardiologie het dier beoordeeld worden.

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

15-20%

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.

Ernstig voor de dieren waarbij diabetes wordt geïnduceerd en een peri-aortale cuff wordt aangebracht en aangedraaid (ergo hoge druk overbelasting).

Ernstig voor de dieren waarbij een peri-aortale cuff wordt aangebracht en aangedraaid.

Matig voor de dieren waarbij alleen alleen diabetes geïnduceerd of alleen een peri-aortale cuff aangebracht wordt, maar níet aangedraaid (sham).

Verdeling naar ongerief in naar verwachting:

Ernstig ongerief: 75%

Matig ongerief: 25%

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.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.532.009
2. Titel van het project: Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen
3. Titel van de NTS : Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ☒ ontvangen door DEC: 26-06-2015
☐ aanvraag compleet:
☒ in vergadering besproken: 13-07-2015 en 26-08-2015
☐ anderszins behandeld:
☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 16-07-2015 tot 30-7-2015
☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met max. 15 werkdagen:
☐ aanpassing aanvraag:
☒ advies aan CCD: 18-9-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- 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: 16-07-2015
- Strekking van de vraag / vragen:
Projectvoorstel
 - 3.2, doel: De DEC mist een duidelijke beschrijving van de samenhang tussen de verschillende modellen. In dit kader merkt de DEC op dat de gebruikte modellen relatief

eenduidig zijn terwijl de redenen van hartfalen bij de mens meestal niet eenduidig zijn. Graag hier aandacht aan besteden.

- 3.2, doel: De DEC heeft meer informatie nodig om tot een oordeel te komen en verzoekt u een tabel toe te voegen die meer inzicht geeft in de targets waaraan u al gewerkt hebt en die voor een deel nog worden onderzocht. Graag de tabel groeperen naar de gebruikte modellen.
- 3.2, doel: Het is de DEC niet duidelijk waarom u stamceltherapie opneemt in de aanvraag. Graag nader toelichten en eventueel in een aparte bijlage verwerken.
- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC mist een meer fundamentele beschrijving voor wat betreft de verschillende aangrijpingspunten die verantwoordelijk zijn voor hartfalen. Graag beschrijven, waarbij u toelicht wat de relevantie is voor wat er in de kliniek te zien is.

Alle bijlagen:

- K. Classificatie van ongerief: De DEC verzoekt u het ongerief uit te splitsen en in percentages aan te geven: hoeveel procent van de dieren zal ernstig, matig, etc. ongerief ervaren?

- Datum antwoord: 30-07-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Projectvoorstel

- 3.2, Doel: In de tekst hebben wij een stuk toegevoegd over de oorzaken van hartfalen bij de mens. Omdat er verschillende oorzaken mogelijk zijn, gebruiken wij ook verschillende diermodellen. Helaas zijn diermodellen altijd een simplificatie van het werkelijke ziektebeeld bij de mens, echter de combinatie van drie verschillende hartfalenmodellen is de hoogst haalbare benadering van de werkelijkheid.
- 3.2, Doel: Wij hebben een tabel toegevoegd met voorbeelden van targets waaraan wij gewerkt hebben. Ook geven wij voorbeelden van toekomstige targets. We vinden het wel van belang de DEC mee te delen dat we bezwaren hebben tegen het vrijgeven van specifieke targets waaraan wij op dit moment werken of in de toekomst aan gaan werken. Dit heeft niet alleen te maken met het mogelijk openbaar worden (in het kader van wet openbaarheid bestuur) van onze doeleiwitten aan onze concurrenten, maar in grotere mate met bescherming van onze doeleiwitten in het kader van patentrecht (intellectual property, IP). Indien een doeleiwit reeds gepubliceerd is kan dit potentieel gezien worden als zogenoemde 'prior art' (stand der techniek). Het gevolg hiervan kan zijn dat we geen IP meer kunnen claimen voor dit doeleiwit, m.a.w. het is niet patenteerbaar/octrooieerbaar. Dit zal tot gevolg hebben dat we niet in staat zullen zijn het doeleiwit verder te ontwikkelen voor het uiteindelijke doel: klinische toepasbaarheid.
- 3.2, Doel: Stamceltherapie is een veel belovende therapeutische strategie voor de behandeling van hartfalen. Onze groep en het ziekenhuis heeft een zeer respectabele

reputatie op het gebied van stamceltherapie in cardiovasculaire ziekten (Gaetani R. et al. J Cell Mol Med 2014, van den Akker F et al. Mediators Inflamm. 2013, Koudstaal S et al. J Cell Mol Med. 2013, van der Spoel TI et al. J Cell Mol Med. 2012, Vrijzen K et al. Curr Opin Organ Transplant. 2009, Noort W.A. et al. Pediatr Cardiol. 2009). Het exacte werkingsmechanisme van stamceltherapie is echter nog niet volledig opgehelderd. Naast de regeneratieve eigenschappen wordt verwacht dat de immuunmodulerende werking van stamcellen, door het uitscheiden van paracrine factoren, een positief effect heeft op de hartfunctie en het herstelproces. Het onderzoek met behulp van stamcellen past dus zeer goed binnen onze aanvraag naar de ontstaanswijze van hartfalen en het doel om nieuwe therapeutische strategieën te ontwikkelen.

- 3.4, Onderzoeksstrategie: Onder punt 3.1 hebben wij de achtergrond van averechts remodeleren en het ontstaansproces van hartfalen toegelicht. Echter klopt het dat de verschillende vormen van hartfalen in de kliniek nog onderbelicht waren, hierom hebben wij het volgende stuk toegevoegd:
Het klinisch beeld van hartfalen patiënten kan erg wisselen. Sommige patiënten ontwikkelen acuut hartfalen, bijvoorbeeld direct na een hartinfarct. Een andere patiëntenpopulatie is die met chronisch hartfalen. In de acute fase spelen inflammatoire processen een belangrijke rol terwijl in de chronische fase, naast ontsteking, fibrose vorming erg belangrijk is. Het tijdstip van ingrijpen en dus ook de patiëntenpopulatie waarop wij ons richten hangt af van het type doelwit. Een inflammatoir doelwit zal zich naar alle waarschijnlijkheid met name richten op de acute fase, hier moet als kanttekening bij geplaatst worden dat inflammatie naast fibrose ook een belangrijke rol heeft in chronisch hartfalen.

Alle bijlagen

- K. Classificatie van ongerief: Wij hebben het ongerief opgesplitst in percentages. Voorbeeld van werkprotocol 1: 35% van de dieren ondergaat een sham operatie of wordt op baseline getermineerd. Dit ongerief wordt ingeschat op: matig. 65% van de dieren ondergaat een LAD ligatie en ontwikkelt hartfalen, dit ongerief is: ernstig. de helft van deze dieren (32.5% van het totaal) zal ofwel een behandeling ondergaan of zodanig genetisch gemodificeerd zijn dat onze verwachting is dat na de LAD ligatie de hartfunctie (ejectie fractie) in mindere mate daalt t.o.v. de wildtype dieren. Deze dieren zullen dus naar onze verwachting niet, of in mindere mate, hartfalen ontwikkelen met als gevolg ook minder ongerief. Of dit tot een vermindering van ernstig naar matig ongerief zal leiden is op voorhand moeilijk in te schatten.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- 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).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan een betere behandeling van hartfalen bij de mens. Hartfalen vormt een belangrijke oorzaak van ziekte en overlijden, en de incidentie zal de komende jaren blijven toenemen. In de huidige situatie kan de ernst van de aandoening met ondersteunende medicatie deels verminderd worden, maar genezing of voorkoming van hartfalen is tot op heden niet mogelijk. Met behulp van het voorliggende project kunnen de verschillende processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen beter in kaart gebracht worden, potentieel therapeutische targets geïdentificeerd worden, en de werkzaamheid van enkele therapeutische interventies getest worden. Therapeutische interventies die in muizenmodellen werkzaam blijken zullen in varkensmodellen gevalideerd worden, zodat in een later stadium translatie naar de klinische praktijk mogelijk is en resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van verbeterde therapieën voor patiënten met hartfalen.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over

voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Specifieke targets worden in het voorliggende project niet genoemd in verband met vertrouwelijkheid en *intellectual property* (IP). Om tegemoet te komen aan de door de DEC aanvaardde eis van bescherming van het IP stelt de DEC voor dat bij indiening van werkprotocollen bij de Instantie voor Dierenwelzijn het te onderzoeken target wordt voorgelegd aan een DEC lid dat goed kan beoordelen of de keuze relevant en de dierproef daarmee verantwoord is. Het desbetreffende DEC lid zal de Instantie voor Dierenwelzijn schriftelijk verslag uitbrengen van zijn/haar bevindingen (zie ook de geformuleerde voorwaarde onder E) .

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Gefokt voor dierproeven (11)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e lid 2)
- ☒ Huisvesting en verzorging
- ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Vanaf de eerste operatie zullen de varkens - en een deel van de dieren ook al enkele dagen ervoor - solitair gehuisvest worden. Solitaire huisvesting is noodzakelijk in verband met medicatietoediening en om schade aan katheters en de zogenaamde aortadevices te voorkomen. De varkens zullen wel in dezelfde ruimte gehuisvest worden, zodat ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien, en het ongerief ten gevolge van solitaire huisvesting beperkt wordt.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is in de bijlagen 1 t/m 4 voor een deel van de dieren ingeschat als matig, omdat deze dieren een sham-operatie ondergaan of bij aanvang van het experiment getermineerd worden. Het betreft hier 35% (bijlage 1), 35% (bijlage 2), 5% (bijlage 3) en 25% (bijlage 4) van de dieren. Voor de andere dieren is het ongerief ingeschat als ernstig, omdat zij hartfalen ontwikkelen. Dit betreft 65% (bijlage 1), 65% (bijlage 2), 95% (bijlage 3) en 75% (bijlage 4) van de dieren. Bij de helft van deze dieren zal het ongerief mogelijk beperkt blijven tot matig ongerief, wanneer zij ten gevolge van een therapeutische interventie of genetische modificatie geen of in mindere mate hartfalen ontwikkelen. In bijlage 5 is het ongerief voor 25% van de dieren ingeschat als matig. Bij hen wordt diabetes geïnduceerd en een sham-operatie uitgevoerd. Voor de overige 75% van de dieren is het ongerief ingeschat als ernstig, omdat zij – al dan niet in combinatie met diabetes – hartfalen ontwikkelen. De DEC is van mening dat deze ongeriefinschattingen realistisch zijn.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De keuze voor de te onderzoeken therapeutische targets is gebaseerd op literatuuronderzoek, bestudering van patiëntengegevens, en in vitro experimenten. De interactie tussen de verschillende inflammatoire en fibrotische processen die bij de ontwikkeling van hartfalen betrokken zijn – en de rol van de therapeutische targets daarin – zijn dermate complex, dat deze niet met computer- of in vitro modellen na te bootsten zijn. In vivo onderzoek is daarom noodzakelijk. In verband met de risico's en de aard van de benodigde gegevens (o.a. histologische analyse van hartweefsel) is het niet mogelijk om het onderzoek in mensen uit te voeren. Aangezien hartfalen bij de mens verschillende oorzaken kan hebben, zal het onderzoek in verschillende diermodellen uitgevoerd worden. De te gebruiken diermodellen zijn weliswaar een simplificatie van het ziektebeeld bij de mens, maar de combinatie van de drie verschillende typen modellen (hartfalen ten gevolge van ischemie, drukoverbelasting of myocarditis) is de hoogst haalbare benadering van de werkelijkheid. Ten behoeve van de translatie naar de mens is het noodzakelijk om het effect van therapeutische interventies die in muizenmodellen werkzaam bleken te zijn, in varkensmodellen te valideren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Er worden alleen targets bestudeerd die op grond van literatuuronderzoek, bestudering van patiëntengegevens, en in vitro experimenten aangemerkt kunnen worden als mogelijke therapeutische aangrijpingspunten. Therapeutische interventies worden alleen in de varkensmodellen onderzocht, wanneer op grond van het onderzoek in de muizenmodellen redelijkerwijs verwacht kan worden dat ze effectief zullen zijn. Het aantal benodigde dieren wordt beperkt door zoveel mogelijk gegevens uit één proefdier af te leiden: waar mogelijk zullen zowel functionele metingen (echocardiografie en drukvolume metingen) gedaan worden, als ook structurele uitkomsten (weefsels, bloed, etc.) geanalyseerd worden. Bij de groeps-grootteberekening is rekening gehouden met een mortaliteit van 20-25%. Dit percentage is gebaseerd op ervaringen in eerdere experimenten. Het is niet mogelijk om de mortaliteit omlaag brengen, omdat een bepaalde mate van schade aan het hart – met het bijbehorende risico op uitval - nodig is om hartfalen te kunnen induceren. Bovenstaande maakt dat de DEC van mening is dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd.
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. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de beschreven diermodellen voor hartfalen. De toegepaste operatietechnieken worden regelmatig uitgevoerd, en zullen indien nodig opnieuw getraind worden om bekwaamheid te onderhouden. De dieren zullen nauwkeurig worden gemonitord, adequate pijnstilling toegediend krijgen, en muizen zullen ook na de operatie in groepsverband gehuisvest worden. Een deel van het onderzoek wordt ten behoeve van de transleerbaarheid uitgevoerd in varkens, omdat zij qua anatomie, (patho)fysiologie, immuunsysteem en metabolisme sterk op de mens lijken.

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

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het in kaart brengen van onderliggende processen betrokken bij de ontwikkeling van hartfalen, het identificeren van therapeutische targets en het testen van therapeutische interventies, substantieel is.

Ten gevolge van de inductie van hartfalen treedt bij een aanzienlijk deel van de dieren ernstig ongerief op, maar de DEC is van mening dat voor de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat de verschillende hartfalenmodellen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren, en er zijn evenmin in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar.

De DEC heeft gediscussieerd over de vraag of dit project een toetsbare eenheid is. Zij heeft vastgesteld dat het hier een drietal dierproeven betreft die allen hartfalen veroorzaken en daarmee samen het spectrum van hartfalen bij de mens nabootsen. Er is dus een duidelijke samenhang tussen de dierproeven, en dat geldt ook voor de wijze waarop de verschillende targets worden onderzocht. Om deze reden acht de DEC dit project een toetsbare eenheid.

Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het ernstige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden: De DEC gaat ermee akkoord dat in het voorliggende project specifieke targets niet genoemd worden in verband met vertrouwelijkheid en patentrecht. Wanneer de werkprotocollen behorende bij deze projectaanvraag aan de Instantie voor Dierenwelzijn worden voorgelegd moet nadere informatie met betrekking tot de doelwitten wel mee aangeleverd worden. Een daarvoor aangewezen DEC lid zal beoordelen of de keuze relevant en de betreffende dierproef daarmee verantwoord is. Het DEC lid zal de Instantie voor Dierenwelzijn schriftelijk verslag uitbrengen van zijn/haar bevindingen.

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015257

Bijlagen

2

Datum 25 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015257. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.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.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ Nieuwe aanvraag
☐ Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 november 2015
Geplande einddatum: 1 november 2020
Titel project: Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3509 GA
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

22 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 90011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015257

Bijlagen

2

Datum 25 september 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 september 2015

Vervaldatum: 25 oktober 2015

Factuurnummer: 15700257

Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015257	€ 741,00

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.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 5 januari 2016 14:26
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Gesprek vergunningen AVD108002015262 en AVD115002015257

Beste [REDACTED]

Het bezwaar van de onderzoeker met betrekking tot de beschikking van project en AVD115002015257 ligt in het feit dat de CCD deze aanvraag niet in zijn geheel als toetsbare eenheid ziet, terwijl de kracht van dit project juist ligt in de koppeling tussen klein- en groot proefdierwerk. De CCD betiteld de muis proeven als fundamenteel en varkens als translationeel, daar zijn de onderzoekers het niet mee eens, muis proeven hoeven niet per definitie echt fundamenteel te zijn, terwijl in varkens ook mechanistisch onderzoek wordt gedaan door deze onderzoekers. De onderzoekers willen dus met name helderheid hebben over wat de CCD een toetsbare eenheid vindt.

Aanwezigen bij het gesprek zijn:

[REDACTED]

Hartelijke groet en tot morgen

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 4 januari 2016 18:03
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Gesprek vergunningen AVD108002015262 en AVD115002015257

Beste [REDACTED]

Bedankt voor je reactie. We zien jullie bezwaren over aanvraag AVD115002015257 morgen graag tegemoet.

Zou je even kunnen aangeven wie er woensdag aanwezig zullen zijn bij het gesprek. Wij moeten bezoekers hier namelijk van te voren aanmelden. Overigens geldt in dit gebouw een legitimatieplicht. Zou je dat willen doorgeven aan diegenen die bij het gesprek aanwezig zullen zijn?

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 4 januari 2016 15:25
Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: RE: Gesprek vergunningen AVD108002015262 en AVD115002015257

Beste [REDACTED]

Na intern beraad heeft de verantwoordelijk onderzoeker van project AVD108002015262 besloten dat een gesprek in dit stadium toch niet nodig is. Zij gaan de vergunning uitvoeren met inachtneming van de door de CCD gestelde voorwaarden. Dank namens hen voor het beschikbaar zijn.

Verantwoordelijk onderzoeker en een vertegenwoordiging van IvD Utrecht zullen wel aanwezig zijn om met jullie te spreken over project AVD115002015257. De bezwaren op schrift zullen uiterlijk morgen per mail naar jullie gestuurd worden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Van: Info-zbo

Verzonden: donderdag 10 december 2015 17:29

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: Gesprek vergunningen AVD108002015262 en AVD115002015257

Beste [REDACTED],

Langs deze weg willen wij u uitnodigen voor een gesprek over vergunningen AVD108002015262 en AVD115002015257.

Het gesprek zal plaatsvinden op woensdag 6 januari 2016 om 15:00

Het adres is: Bezuidenhoutseweg 73, 2500 EK, Den Haag [REDACTED]

Bij EZ is legitimatie verplicht. Graag ontvangen wij van u z.s.m. wie er bij het gesprek aanwezig zullen zijn, zodat wij deze personen bij de portier kunnen aanmelden.

Tot slot zouden wij u willen vragen voor het gesprek uw bezwaren op papier te zetten en ons deze toe te sturen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

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 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.

Addendum behorende bij AVD115002015257

Beschrijving beslis/keuzemomenten

Doel: Het primaire doel van onze onderzoeksvraag is het verbeteren van de hartfunctie in patiënten met hartfalen. We onderscheiden in de kliniek verschillende vormen van hartfalen, ischemische en niet-ischemisch hartfalen (zowel bij mensen als proefdieren). In de meeste gevallen wordt hartfalen veroorzaakt door een hartinfarct en/of door hoge bloeddruk (hypertensie). Bij een hartinfarct is vanwege een stolsel in een van de kransslagaders (tijdelijk) de bloedtoevoer naar het hart sterk verminderd of zelf volledig geblokkeerd. Hierdoor sterven hartspiercellen (cardiomyocyten), wat leidt tot een ontstekingsreactie in het hart en uiteindelijk tot het ontstaan van bindweefsel. Bij een hoge bloeddruk ontstaat er drukoverbelasting van het hart waardoor er ook bindweefsel in het hart ontstaat. Door de vorming van dit bindweefsel verliest het hart pompkracht en heeft het meer moeite om het bloed rond te kunnen pompen. Om nieuwe therapieën te kunnen ontwikkelen en valideren voor bovenstaande processen (doelgebieden) is het essentieel voor het begrip van zowel mechanisme als vertaling naar een nieuw therapeutisch middel dat er een goede afstemming en koppeling plaats vind van onderzoek in kleine (fase I) en grote proefdieren (fase II).

We hebben 2 modellen beschikbaar om ischemisch hartfalen (ischemie en ischemie-reperfusie) en 2 modellen om niet-ischemisch hartfalen (druk overbelasting en auto-immuun (laatste alleen in fase I) na te bootsen. Daarnaast onderscheiden we in het proces van hartfalen van de diermodellen, de acute reactie (<3 dagen) en de chronische reactiefase (>3 dagen) in het herstel van de hartspierschade.

In alle modellen hanteren we, als primaire read-out voor een succesvolle therapie, een verbetering in hartfunctie ten opzichte van een controle groep. Het succes van de behandeling stellen we vast aan de hand van of a) infarct grootte, b) volumes van het hart en/of c) wanddikte/functie van het hart (n.b. de verbetering van functie moet minimaal in 1 van deze 3 domeinen zichtbaar zijn).

Beslissingsmoment: Zodra een proof-of-concept wordt gevonden dat een nieuwe therapie vorm of aanpak werkt in fase I (kleine proefdier), dan is, vanwege een aantoonbaar slechte translatie van muis naar mens, een vertaling naar fase II (grote proefdier) nodig voor autoriteiten/artsen om een start te kunnen maken met een first-in-man humane studie. Om de transitie van fase I en II te definiëren, hebben wij heldere criteria voor het cardiovasculaire veld geformuleerd die altijd getoetst zullen worden door een intern ingestelde wetenschapscommissie (bestaande uit direct betrokken onderzoekers [REDACTED] en [REDACTED] en een onafhankelijk expert ([REDACTED] en/of clinicus ([REDACTED])).

Vanuit onze eigen ervaringen en duidelijk geaccepteerd door het wetenschappelijk veld, is een significante verbetering in hartfunctie van meer dan 10% in de acute reactie en meer dan 5% in de chronische reactie klinisch/wetenschappelijk relevant. We hanteren 3 categorieën in onze beslissingen:

1. Zodra een effect gelijk aan, of groter is dan 10% (acuut model) of 5 % (chronisch model) behaald wordt, dan mag fase II ingezet gaan worden.
2. Met een effect grootte van 8-10% (acuut model) of 3-5% (chronisch model) zal geen fase II gestart gaan worden, maar kan er eventueel een heroverweging plaats vinden. Deze heroverweging kan gedaan worden indien er nieuwe inzichten zijn met betrekking tot bijvoorbeeld dosering of behandel-schema. Hier kan de keuze gemaakt worden of er a) opnieuw in fase I getest gaat worden, of b) er teruggegaan wordt naar de in vitro setting (om compound effectiviteit of dosis te optimaliseren) of c) het target losgelaten wordt. Voor een schematische weergave van het beslissingsmodel zie figuur 1.
3. Bij effect groottes die kleiner zijn dan 8% (acuut) of 3% (chronisch) zal er geen vervolg plaats vinden.

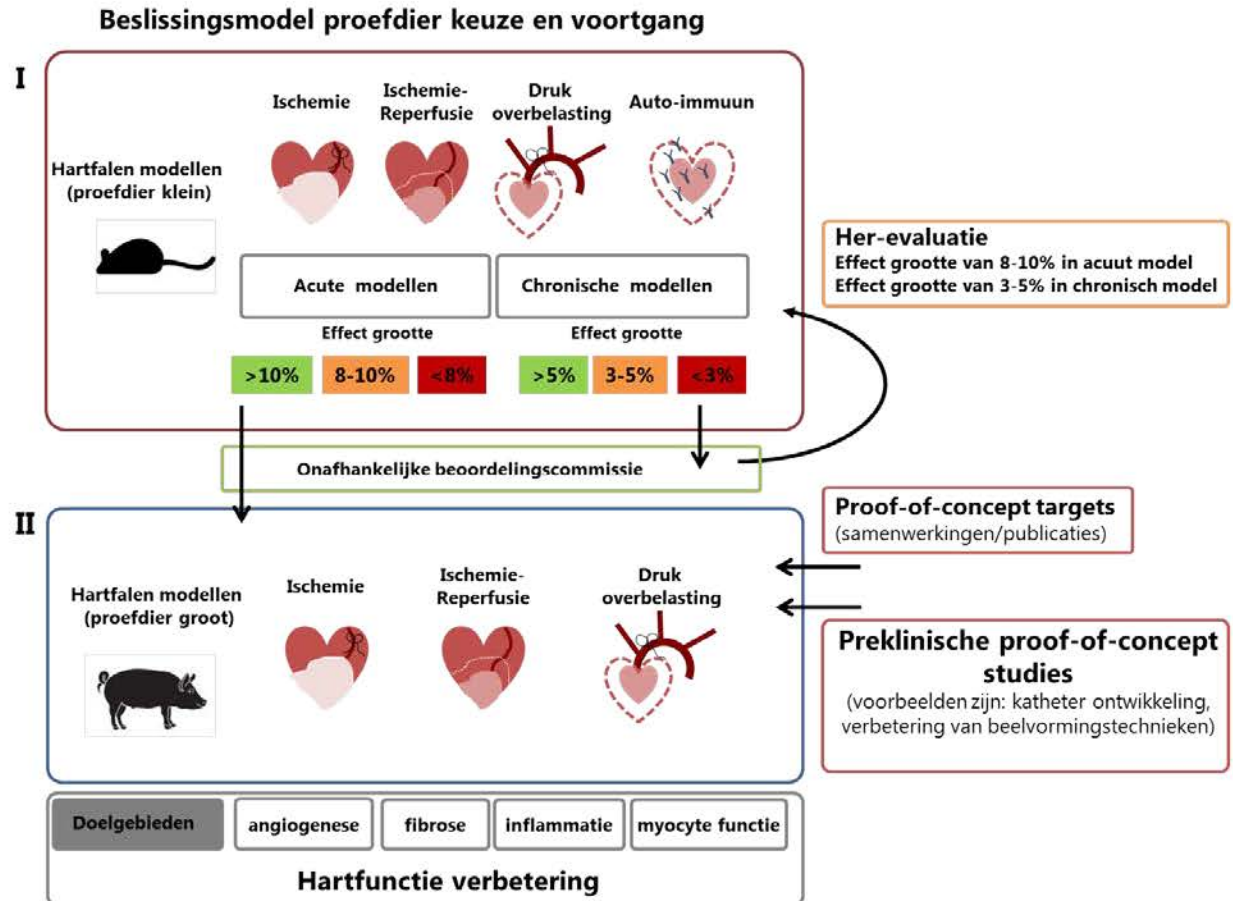
Direct pre-translatieel (fase II)

In principe zullen de meeste stoffen die in fase II modellen getest worden een effectiviteit hebben laten zien in fase I modellen en voldaan hebben aan een van de gestelde criteria > 10% (acuut model) of > 5 % (chronisch model) zoals hier boven beschreven. Echter er kunnen interessante stoffen zijn die elders (samenwerkingen / publicaties) in een proof of concept al effectiviteit hebben laten zien (welke voldoet aan de hierboven beschreven criteria) of als er aantoonbare limitaties (bijvoorbeeld grootte van het hart, of beschikbaarheid van een medicijn, vanuit een ander ziektebeeld, welke werkzaam is in het varken en niet in de muis) zijn aan het gebruik van modellen uit fase I waardoor direct de keuze gemaakt wordt deze stoffen in modellen van fase II te onderzoeken. Enkele voorbeelden van limitaties in fase I modellen voor deze aanvraag zijn het gebruik van katheters ten behoeve van lokale afgifte van stoffen in het hart en het verbeteren van beeldvormingstechnieken om de therapeutische werking van nieuwe middelen te kunnen monitoren. Deze katheters en beeldvormingstechnieken zijn gebaseerd op de ziekenhuissetting en daardoor fysiek niet toepasbaar in de modellen die vallen onder fase I.

Domein

De mate van vermindering in pompkracht ontstaat uit een conjunctie van verschillende processen, de doelprocessen waar onderzoek naar gedaan wordt vallen onder de domeinen: a) bloedvat-remodelering (angiogenese), b) littekenvorming (fibrose), c) weefselontsteking

(inflammatie) en d) werkzaamheid van de hartspiercel (myocyte functie). Voorbeelden van specifieke targets zijn te vinden in tabel 1 van het projectvoorstel.



Figuur 1



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

t.a.v. Instantie voor dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD115002015257-1

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 01 maart 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen' met aanvraagnummer AVD115002015257 waarvoor op 27 november 2015 een vergunning is afgegeven. Op 6 januari 2016 en 01 februari 2016 heeft u met nieuwe feiten en omstandigheden aangevoerd dat de argumentatie van de CCD om de vergunning slechts gedeeltelijk te verlenen niet juist is. In aanvulling op uw aanvraag heeft u op 01 februari 2016 nieuwe informatie aangeleverd over de keuzemomenten in het project en de te onderzoeken processen. Wij hebben op basis van uw schrijven het besluit opnieuw beoordeeld.

Beslissing

Naar aanleiding van mondeling en schriftelijk overleg met u heeft de CCD haar besluit heroverwogen en besloten de vergunning van uw project 'Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen' met aanvraagnummer AVD115002015257 te herzien en de aanvraag alsnog geheel te vergunnen. De vergunning van 27 november 2015 wordt hierbij ingetrokken en vervangen door bijgesloten vergunning d.d. 01 maart 2016. De vergunning wordt afgegeven tot en met 01 november 2020. De vergunning is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD115002015257-1

Voorwaarde

In de vergunning zoals afgegeven op 27 november 2015 was een specifieke voorwaarde opgenomen om te borgen dat alleen relevante doelwitten onderzocht zullen worden. U heeft in het gesprek van 06 januari 2016 aangegeven het onderzoek te kunnen beperken tot de in de aanvraag genoemde doelwitten. In aanvulling daarop heeft u op 1 februari 2016 aangegeven naar welke doelprocessen u onderzoek zult gaan doen. U dient uw onderzoek te beperken tot de in de aanvraag en aanvullende informatie genoemde processen en doelwitten. Wij zijn, op basis van bovenstaande informatie, van mening dat de noodzaak voor de in de vergunning van 27 november 2015 genoemde voorwaarde is komen te vervallen. Om te borgen dat u uw onderzoek inderdaad beperkt tot de in de brief van 01 februari 2016 genoemde processen en in het projectvoorstel genoemde doelwitten is een voorwaarde toegevoegd aan de vergunning.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd d.d. 18 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie

grotendeels over met uitzondering van bovenstaande afwijkingen. In aanvulling op het DEC advies hebben wij ook een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv 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: UMC Utrecht
Postbus: 12007
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 maart 2016 tot en met 01 november 2020, voor het project 'Nieuwe therapeutische aangrijpingspunten voor hartfalen' met aanvraagnummer AVD115002015257-1, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 september 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 september 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 september;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen per digitale indiening op 18 september 2015
 - d. Aanvullende informatie, zoals mondeling ontvangen op 06 januari 2016 en zoals ontvangen bij digitale indiening op 1 februari 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1: Ischemisch hartfalen (LAD ligatie), muis	Muis	9611	Matig: 35% Ernstig: 65%
3.4.4.2: Hartfalen als gevolg van drukoverbelasting (TAC), muis	Muis	4840	Matig: 35% Ernstig: 65%
3.4.4.3: Hartfalen als gevolg van myocarditis, muis	Muis	3300	Matig: 5% Ernstig: 95%
3.4.4.4: Varkensmodel voor ischemisch hartfalen	Varkens	880	Matig: 25% Ernstig: 75%
3.4.4.5: Varkensmodel voor hartfalen ten gevolge van drukoverbelasting	Varkens	320	Matig: 25% Ernstig: 75%

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk 01 februari 2021 plaatsvinden.

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

- 1) Het onderzoek dient zich te beperken tot de in de brief van 01 februari 2016 genoemde doelprocessen en de in het projectvoorstel genoemde specifieke targets.

Datum

01 maart 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD115002015257-1

Algemene voorwaarde

2) In artikel 10, lid 1a van de wet, 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

Datum

01 maart 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD115002015257-1

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.