

[illegible]



14 APR. 2016

**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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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?

Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11400  
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

|                                                     |                                                        |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Naam instelling of organisatie                      | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]                                             |

|            |          |
|------------|----------|
| KvK-nummer | 64156338 |
|------------|----------|

- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

|                      |              |      |
|----------------------|--------------|------|
| Straat en huisnummer | de Boelelaan | 1117 |
|----------------------|--------------|------|

|         |  |
|---------|--|
| Postbus |  |
|---------|--|

|                    |        |           |
|--------------------|--------|-----------|
| Postcode en plaats | 1081HV | Amsterdam |
|--------------------|--------|-----------|

|      |  |
|------|--|
| IBAN |  |
|------|--|

|                                       |                                            |
|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | Afdeling crediteuren<br>VU Medisch Centrum |
|---------------------------------------|--------------------------------------------|

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

|                             |            |                                     |
|-----------------------------|------------|-------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|-----------------------------|------------|-------------------------------------|

|         |            |
|---------|------------|
| Functie | [Redacted] |
|---------|------------|

|          |            |
|----------|------------|
| Afdeling | [Redacted] |
|----------|------------|

|                |            |
|----------------|------------|
| Telefoonnummer | [Redacted] |
|----------------|------------|

|             |            |
|-------------|------------|
| E-mailadres | [Redacted] |
|-------------|------------|

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

|                             |            |                                     |
|-----------------------------|------------|-------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | X Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 1 - 6- 2016 |
| Einddatum  | 1 - 6- 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                             |
|-------------|---------------------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres   | Amsterdam   Nederland                       |
| E-mailadres |                                             |

## 4 Betaalgegevens

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>4.1 Om welk type aanvraag gaat het?</p> <p>4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.<br/><i>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.</i></p> | <p>X Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187      Lege</p> <p><input type="checkbox"/> Wijziging €      Lege</p> <p><input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso</p> <p>X Na ontvangst van de factuur. Er blijkt dat bij de factuur een inkoopordernummer (geplaatst op de factuur) vermeld dient te worden.<br/><b>het inkoopordernummer is 4573361</b><br/>Zonder het nummer kan de crediteurenadministratie van het VUmc de betaling helaas niet in behandeling nemen. Alvast bedankt.</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 5 Checklist bijlagen

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

## 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 1.7). 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       | Amsterdam                                                                |
| Datum        | // <span style="background-color: black; color: blue;">          </span> |
| Handtekening |                                                                          |





Beste Centrale Commissie dierproeven,

Er blijkt dat bij de factuur een inkoopordernummer vermeld dient te worden (geplaatst op de factuur). Het inkoopordernummer is **4573361**. Graag zouden wij u willen vragen om dit nummer toe te voegen bij de factuur. Zonder het nummer kan de crediteurenadministratie van het VUmc de betaling helaas niet in behandeling nemen.

Alvast bedankt.

Met vriendelijke groet,

Daisy Dessens

Daisy Dessens, MSc  
Secretaris DEC VU-VUmc  
Arbo & Milieu



VRJE  
UNIVERSITEIT  
AMSTERDAM

HRM, Arbo  
& Milieu

T (020) 59 89038 | [d.dessens@vu.nl](mailto:d.dessens@vu.nl) | WERKDAGEN: ma – do |  
POSTADRES: van der Boechorststraat 1, 1081 BT Amsterdam |  
BEZOEKADRES: van der Boechorststraat 1, 1081 BT Amsterdam | [Disclaimer](#)





## 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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
- ☐ 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.

Myocarditis is een ontstekingsziekte van het myocard (= hartspier). In de meeste gevallen wordt myocarditis veroorzaakt door een virale infectie danwel een auto-immuun respons tegen eiwitten van het myocard. Beide vormen zijn aan elkaar gerelateerd, maar verschillen in pathofysiologie. Een veel voorkomende complicatie bij myocarditis patiënten is het ontstaan van atrium (= boezem) fibrilleren (= hartritmestoornis). Dit kan grote gevolgen hebben voor de patiënt, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte.

Atriale ontsteking is een bekende onderliggende oorzaak van atriumfibrilleren, en we hebben onlangs aangetoond dat patiënten met myocarditis significant meer ontstekingscellen in de atria hebben dan patiënten zonder myocarditis. Atriumfibrilleren is moeilijk te behandelen, en huidige therapieën zijn er op gericht om de gevolgen van atriumfibrilleren te beperken. Vanuit klinisch oogpunt zou het daarom erg waardevol zijn om bij patiënten met een predispositie voor atriumfibrilleren (zoals bij een ontsteking in het atrium) dit vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen, om hierdoor de incidentie van atriumfibrilleren bij myocarditis te verlagen. Hoewel er algemene biomarkers zijn die ontsteking kunnen aantonen in het bloed, kunnen deze niet specifiek aan de atria worden gekoppeld en zijn dus niet bruikbaar voor het specifiek diagnosticeren van atriale ontsteking. Hierdoor zijn er nieuwe biomarkers nodig, die wel specifiek zijn voor ontsteking in de atria.

Dit project heeft daarom als doel het vinden van biomarkers waarmee atriale ontsteking kan worden gediagnosticeerd in myocarditis.

Voor dit onderzoek is het noodzakelijk om gebruik te maken van dierexperimenteel onderzoek. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren met bloed van myocarditis patiënten omdat we van deze patiënten geen atriaal hartweefsel kunnen afnemen, wat nodig is om te bewijzen dat de biomarker verhoogd tot expressie komt bij ontsteking in de atria.

In dit project gaan wij hiervoor gebruik maken van twee modellen van de meest frequent voorkomende vormen van myocarditis bij patiënten: autoimmuun myocarditis en acute virale myocarditis. Myocarditis is een brede ziekte is met meerdere onderliggende mechanismen (bij de meeste myocarditis patiënten is myocarditis de oorzaak van óf een acute virale infectie, óf een autoimmuunrespons) en uiteenlopende klinische symptomen. Het toepassen van beide modellen is noodzakelijk, omdat we van potentieel interessante biomarkers voor atriale ontsteking willen weten of deze extrapoleerbaar zijn niet alleen naar patiënten met autoimmuun myocarditis, maar ook naar patiënten met een acute virale myocarditis.

Voor de eerste vorm maken wij gebruik van een rat model van experimentele autoimmuun myocarditis (EAM). Dit is een goed beschreven model dat wereldwijd gebruikt wordt.

Voor acute virale myocarditis zijn er geen geschikte rat-modellen. Hiervoor maken wij gebruik van een muismodel van acute coxsackievirus B3-geïnduceerde myocarditis. Dit model wordt wereldwijd als dusdanig gebruikt, en hiermee hebben wij zelf ook ervaring.

---

### 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 onderzoeksproject heeft het volgende doel:

**Het vinden van diagnostische biomarkers in het bloed, die specifiek zijn voor ontsteking in de atria.**

Het muis-model voor acute virale myocarditis is een goedlopend model waar wij zelf al veel ervaring hebben. We hebben zelf het rat-model voor EAM nog niet eerder gebruikt, maar we hebben nauw contact met een andere onderzoeksgroep die ervaring heeft met dit model. We verwachten derhalve niet dat het toepassen van het rat-model bij ons veel problemen zal opleveren. Voor de analyses die wij willen

uitvoeren is alle benodigde apparatuur en expertise aanwezig op onze afdeling. We hebben al een onderzoeks-beurs binnengehaald voor dit project, dus ook op financieel gebied verwachten we dat dit project haalbaar is.

---

### **3.3 Belang**

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

#### **Wetenschappelijk belang:**

Er is weinig bekend van het effect dat myocarditis precies heeft op de atria. Door de analyses die wij gaan uitvoeren krijgen we een beter overzicht van de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking. Dit is belangrijk om de fundamentele kennis met betrekking tot ontsteking in het hart te vergroten.

#### **Maatschappelijk belang:**

Atriumfibrilleren is een chronische aandoening. In een vroege fase kan atriumfibrilleren behandeld worden met medicatie, maar naarmate de aandoening verergert (permanente atriumfibrilleren) kan het niet meer met medicatie worden behandeld, en kan atriumfibrilleren tot ernstige complicaties leiden zoals hartfalen, beroerte of plotselinge hartdood. Atriumfibrilleren komt voor bij circa 2% van de bevolking, en de incidentie groeit jaarlijks. Myocarditis is een van de hartaandoeningen die kan leiden tot atriumfibrilleren. Een belangrijk gegeven is dat myocarditis, in tegenstelling tot andere hart- en vaatziekten, ook veel bij jonge mensen voorkomt.

Deze studie zal bijdragen aan de ontwikkeling van diagnostische biomarkers om atriale ontsteking in myocarditis patiënten te identificeren. Hiermee kan een predispositie voor atriumfibrilleren worden opgespoord en daarna behandeld worden. Dit zal er uiteindelijk tot doen leiden dat de incidentie van atriumfibrilleren en de daaraan gerelateerde morbiditeit en mortaliteit omlaag gaat.

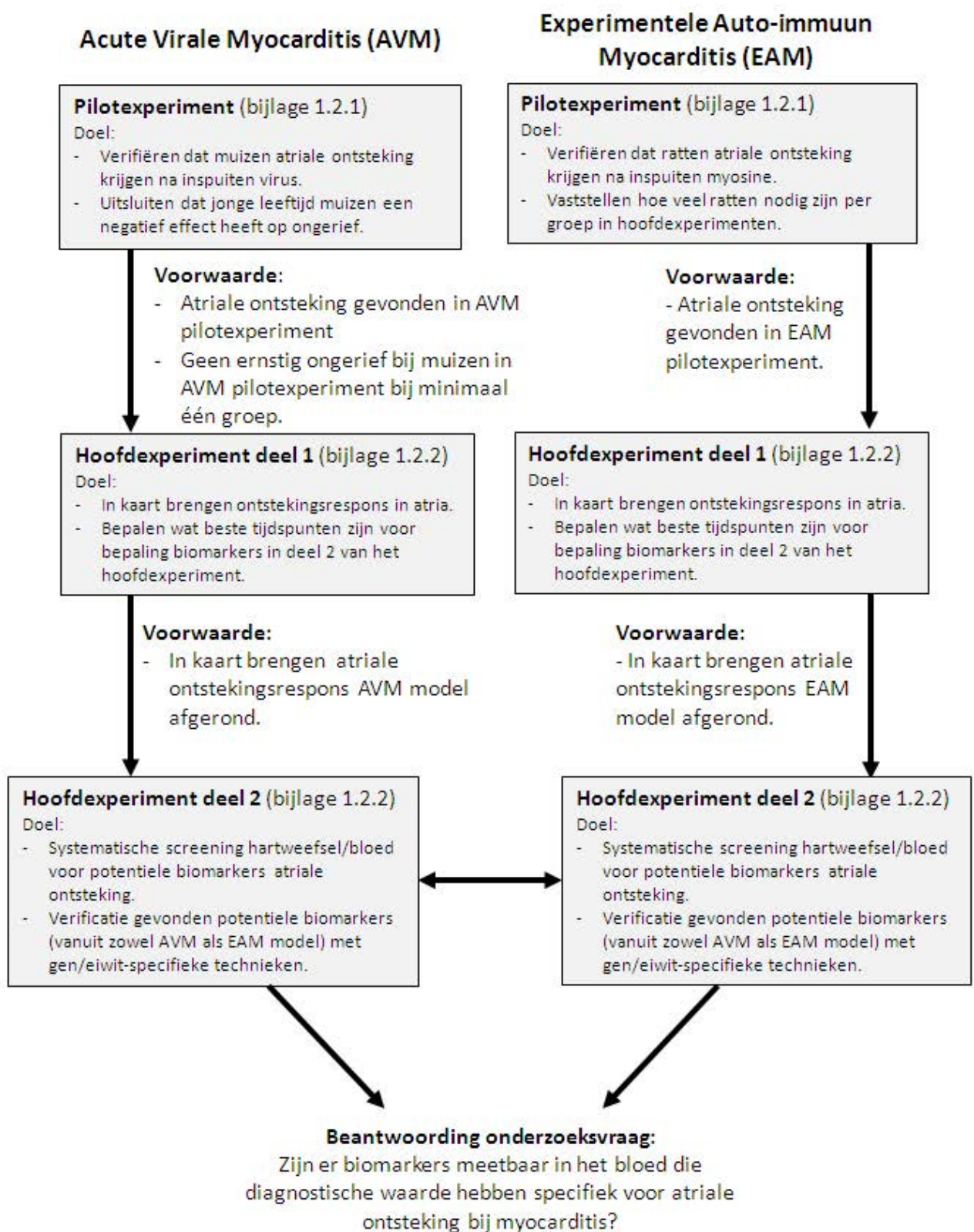
---

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

The studie heeft de volgende opzet:





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

**Pilotexperiment:**

In een pilotexperiment wordt beoordeeld of het induceren van acute virale myocarditis en EAM in respectievelijk muizen en ratten resulteert in ontsteking in de atria. Bij het acute virale myocarditis model maken we gebruik van jongere muizen (4 en 5 weken oud) dan we in het verleden hebben gebruikt (6 weken oud). De reden hiervoor is dat jongere muizen gevoeliger zijn voor het ingespoten virus, wat de kans groter maakt dat de muizen ontsteking in de atria ontwikkelen. We moeten dan ook hier controleren of deze extra gevoeligheid niet resulteert in ernstig ongerief.

Omdat wij zelf nog geen ervaring hebben met het EAM model willen wij, in samenwerking met een groep die ervaring heeft met het EAM model, in dit pilotexperiment ook het model hier operationeel maken. Onderzoeken of EAM resulteert in ontsteking in de atria gebeurt in dezelfde ratten. Op basis van deze pilot willen we inschatten hoe groot de groepsgroottes moeten worden bij de hoofdexperimenten (i.v.m. EAM-gerelateerde uitval van ratten)

**Hoofdexperiment:**

In deel 1 het hoofdexperiment gaan we eerst voor beide modellen op verschillende tijdstippen na het induceren van acute virale myocarditis / EAM de mate van ontsteking en remodeling bepalen in de atria. Met deze informatie kunnen wij een overzicht en tijdslijn maken van de ontstekingsrespons in de atria. Het eerst in kaart brengen van deze ontstekingsresponsen is essentieel voor de voortgang van het project, omdat we zonder deze informatie niet weten we op welke tijdstippen we mee moeten nemen voor de biomarker-analyses.

Op het tijdstip dat we de meeste ontsteking vinden (dit tijdstip wordt per model apart bepaald), wordt er in deel 2 van het hoofdexperiment voor beide modellen een systematische analyse gedaan (bijvoorbeeld een RNAseq of proteomics analyse). Deze analyse wordt op nieuwe groepen dieren uitgevoerd omdat we de complete harten ingevroren nodig hebben voor deze analyses, terwijl voor het in kaart brengen van de ontstekingsrespons in deel 1 van het hoofdexperiment het nodig is dat de atria zijn gefixeerd in formaldehyde. Het doel van deze analyse is om potentieel interessante genen/eiwitten te vinden die specifiek tot expressie komen bij atriale ontsteking en hierdoor van diagnostische waarde zijn voor atriale ontsteking. Deze potentiële biomarkers worden vervolgens verder onderzocht met analyses specifiek gericht op individuele genen/eiwitten (bijvoorbeeld een qPCR of ELISA) in zowel het model voor EAM als het model voor acute virale myocarditis. Voor elk model voeren we deze specifieke analyses uit voor potentiële genen/eiwitten afkomstig vanuit de systematische analyses van beide modellen. Hierdoor krijgen we een goed beeld in hoeverre potentiële biomarkers extrapol eerbaar zijn naar patiënten met verschillende vormen van myocarditis (acute virale myocarditis of EAM). Voor deze specifieke analyse is ook ingevroren hartweefsel nodig.

---

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.

---

De studie begint met het uitvoeren van het pilotexperiment voor beide modellen. De samenhang van de componenten en de voorwaarden die op verschillende punten in de studie nodig zijn om verder te gaan naar het volgende onderdeel staan weergegeven in het schema van 3.4.1.

Er zitten in totaal vier keuzemomenten/voorwaarden in de opzet van de studie:

- Om met het hoofdexperiment te beginnen van het EAM model, moet er eerst in het pilotexperiment van het EAM model worden aangetoond dat in dit model atriale ontsteking plaats vindt.
- Om met het hoofdexperiment te beginnen van het acute virale myocarditis model, moet er eerst in het pilotexperiment van het acute virale myocarditis model worden aangetoond dat in dit model atriale ontsteking plaats vindt. Ook moet deze atriale ontsteking induceerbaar zijn zonder ernstig ongerief te veroorzaken voor de muizen.
- Voor beide modellen kan er pas gestart worden met deel 2 van het hoofdexperiment als het in kaart

brenge van de ontstekingsrespons in de atria is afgerond in deel 1 van het hoofdexperiment.

Gezamenlijk kunnen deze experimenten de onderzoeksvraag 'Zijn er biomarkers meetbaar in het bloed die diagnostische waarde hebben specifiek voor atriale ontsteking bij myocarditis?' beantwoorden. Het gebruik van beide modellen is hiervoor essentieel omdat we alleen met beide modellen een compleet beeld kunnen krijgen in hoeverre de gevonden biomarkers in deze studie extrapoleerbaar zijn naar de totale myocarditis patiëntenpopulatie.

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

| Volgnummer | Type dierproef                           |
|------------|------------------------------------------|
| 1          | Pilotexperiment                          |
| 2          | Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) |
| 3          |                                          |
| 4          |                                          |
| 5          |                                          |
| 6          |                                          |
| 7          |                                          |
| 8          |                                          |
| 9          |                                          |
| 10         |                                          |



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |                    |                 |
|-----|--------------------------------------------------|--------------------|-----------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 11400              |                 |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | VU medisch centrum |                 |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer         | Type dierproef  |
|     |                                                  | 1                  | Pilotexperiment |

*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.

Het pilotexperiment wordt voor beide myocarditis-modellen (acute virale myocarditis en EAM) uitgevoerd.

**Acute virale myocarditis.** Het is bekend dat coxsackievirus B3 infectie bij muizen kan zorgen voor ontsteking in de atria. Ook is bekend dat muizen gevoeliger zijn voor coxsackievirus B3 infectie als ze jonger zijn. In het verleden hebben wij experimenten uitgevoerd met dit model, waarbij we muizen van 6 weken oud gebruikten. Deze muizen zijn echter te oud om atriale ontsteking te krijgen. In dit pilotexperiment injecteren we twee groepen jongere muizen (4 weken oud en 5 weken oud) met dit virus. Hierbij kijken we of de jongere muizen atriale ontsteking ontwikkelen, en of er een verschil is in de hoeveelheid ontsteking in de atria tussen de twee leeftijden. Ook bestaat er een kleine kans dat de grotere gevoeligheid voor het virus (bij 4 weken oud) ook een negatief effect heeft op het ziekteverloop van de muizen. Dit willen wij uitsluiten voordat we verder gaan met het hoofdexperiment.

Primaire uitkomstparameters:

- *Hoeveelheid ontsteking in atria.* Dit wordt gemeten aan de hand van de hoeveelheid ontstekingscellen in de atria. Dit vergelijken we met atria van ongeïnfecteerde muizen uit voorgaande experimenten.
- *Ongerief van de muizen.* Hierbij wordt gelet op uiterlijke kenmerken van ongerief (pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en afname in gewicht van de muis, wat we bepalen met een weegschaal.

Indien de jongere muizen atriale ontsteking ontwikkelen en dit niet zorgt voor ernstig ongerief, dan kan voor het acute virale myocarditis model worden overgegaan naar het hoofdexperiment.

### **Experimentele Auto-immuun Myocarditis.**

Vanuit literatuur is al bekend dat ratten na inductie van EAM ontsteking in de atria kunnen ontwikkelen. Voor EAM heeft het pilotexperiment twee doelen. Ten eerste willen we vast stellen of wij, in samenwerking met een groep die ervaring heeft met dit model, EAM kunnen induceren bij ratten, evenals of bij deze ratten atriale ontsteking ontstaat wanneer wij EAM induceren.

Ook willen wij in dit pilotexperiment bepalen of de verwachte uitval (20% uitval tussen dag 18 en 21 na inductie EAM, gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen) ook van toepassing is als wij de EAM induceren. Deze bepaling is essentieel, aangezien we voor de hoofexperimenten ook groepen ratten nodig hebben waarbij de atriale ontsteking al voorbij is, wat betekent dat deze ratten langer dan 21 dagen in de proef moeten blijven.

Primaire uitkomstparameters:

- *Hoeveelheid ontsteking in atria.* Dit wordt gemeten aan de hand van de hoeveelheid ontstekingscellen in de atria. Dit vergelijken we met atria van controle ratten uit voorgaande experimenten (met andere modellen).
- *Ongerief en uitval van de ratten.* Hierbij wordt gelet op uiterlijke kenmerken van ongerief (pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en afname in gewicht van de rat, wat we bepalen met een weegschaal. Onder 'uitval' wordt het percentage van de dieren verstaan dat door het bereiken van een humaan eindpunt uit de proef wordt gehaald danwel spontaan overlijdt. Naast het percentage dieren dat uitvalt, kijken we in het pilotexperiment ook of de uitval plaats vindt in de periode van 18-21 dagen na inductie van EAM.

Indien de ratten atriale ontsteking ontwikkelen dan kan voor het EAM model worden overgegaan naar het hoofdexperiment. Indien de ratten door het bereiken van een humaan eindpunt uit de proef moeten worden gehaald, dan geldt dit als ernstig ongerief. Aan de hand van de hoeveelheid ratten dat uitvalt, bepalen we de benodigde groepsgroottes voor het hoofdexperiment.

---

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 muizen krijgen eenmalig een injectie (i.p.) met 100.000 partikels coxsackievirus B3. Van de dosis en wijze van toediening weten we uit eerdere ervaringen dat in vrijwel alle muizen een identiek ziektebeeld en myocarditis veroorzaakt.

De ratten krijgen eenmalig, onder anesthesie (voor immobilisatie van de dieren), een injectie in de poot om de EAM op te wekken, met hierin een mix van varkens-mysine en Complete Freund's Adjuvant (CFA). Wij hebben contact met een onderzoeksgroep dat ervaring heeft met het EAM model, en uit onderzoek van deze groep is gebleken dat het injecteren van deze mix in de poot de meest betrouwbare methode is om EAM op te wekken.

Bij de EAM-ratten die worden gebruikt om de uitval te bepalen wordt onder de anesthesie wanneer de terminatie wordt uitgevoerd ook bloed afgenomen.

---

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

Aangezien het om een pilotexperiment gaat, hebben we besloten dat het niet zinvol is om de experimenten te onderwerpen aan berekeningen voor statistische significantie. Hierdoor kunnen we de groepen vrij klein houden en hoeven we geen controle dieren op te voeren.

### **B. De dieren**

---

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

---

**Acute virale myocarditis:**

**Diersoort:** C3H muizen. Dit is de muizenstam waarmee wij al ervaring hebben voor acute virale myocarditis.

**Herkomst:** Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

**Geschatte aantallen:** maximaal 15 dieren.

We hebben 2 maal 5 muizen nodig (voor beide leeftijden 1 groep) om te beoordelen of de muizen atriale ontsteking en wel/geen ernstig ongerief krijgen. De overige 5 muizen zijn reserve als door onvoorziene omstandigheden het nodig is om een derde groep muizen op te voeren.

**Levensstadia:** 4 of 5 weken oud bij inductie acute myocarditis. Dit zijn de twee leeftijden waarvan we in het pilotexperiment willen onderzoeken of atriale ontsteking kan worden geïnduceerd in afwezigheid van ernstig ongerief.

**EAM:**

**Diersoort:** Lewis ratten. Dit is wereldwijd de meest gebruikte ratten-stam voor EAM modellen, en is ook de stam die gebruikt wordt met de onderzoeksgroep met wie wij contact hebben over het opzetten van dit model.

**Herkomst:** Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

**Geschatte aantallen:** maximaal 29 dieren.

Om te testen of we met EAM atriale ontsteking kunnen induceren hebben we 3 ratten nodig. Omdat we zelf nog geen ervaring hebben met dit model vragen wij ook 12 ratten als reserve aan. Met deze (reserve) ratten kunnen we het nog een aantal keer opnieuw proberen (in overleg met onderzoeksgroepen die dit model eerder gebruikt hebben) indien het niet gelijk lukt om de ratten atriale ontsteking te geven.

Voor de hier-opvolgende uitval-bepaling gebruiken wij 14 dieren. We willen om het aantal benodigde dieren te beperken deze groep toevoegen aan de analyse waarbij we de atriale ontstekingsrespons in kaart brengen. (zie bijlage '*Biomarkers vaststellen en valideren (hoofdexperiment)*'). Hierdoor willen we inclusief uitval minimaal 10 dieren over houden voor de analyse).

Het aantal van 10 ratten per groep voor analyse is gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen met dit model, waaruit dat blijkt dat groepen van 10 voldoende zijn om significante verschillen te kunnen aantonen op ontstekingsfactoren.

**Levensstadia:** circa 7 weken oud bij inductie EAM. De groep waarmee we contact hebben over dit model hanteert deze leeftijd.

Voor zowel het acute virale myocarditis model als het EAM model maken wij gebruik van mannelijke dieren. De reden hiervoor is dat in beide modellen mannetjes veel gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis dan vrouwtjes (*Frisancho-Kiss et al. Brain Res 2006;1126:139-147*). Omdat deze modellen minder goed werken in vrouwelijke dieren, zijn wij niet van mening dat het op dit punt al zinvol is om een onderscheid te maken tussen mannetjes en vrouwtjes. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap wordt gemaakt naar onderzoek bij patiënten.

**C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

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

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

##### **Vervanging:**

Ontstekingsreacties zijn complexe processen waarbij meerdere orgaansystemen betrokken zijn. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsresponsen na te bootsen met in vitro of ex vivo technieken.

##### **Vermindering:**

Aangezien het om een pilotexperiment gaat, hebben we besloten dat het niet nodig is om de experimenten te onderwerpen aan berekeningen voor statistische significantie. Hierdoor kunnen we de groepen vrij klein houden en hoeven we geen dieren te gebruiken voor een controle groep. Doordat we EAM induceren door injectie in de poot ontwikkelt 100% van de ratten EAM. Hierdoor hoeven we geen extra dieren op te voeren om hiervoor te compenseren.

##### **Verfijning:**

In deze studie maken we gebruik van de C3H muizenstam. Deze muizenstam heeft de eigenschap dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt in vergelijking met andere muizenstammen, waardoor de muizen relatief weinig ongerief zullen hebben. Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt.

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.

Om het ongerief voor de dieren te beperken worden de dieren gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden (temperatuur, lichtintensiteit en 12:12 uur dag:nacht cyclus). Ook krijgen de dieren na binnenkomst in het proefdiercentrum minimaal een week om te acclimatiseren.

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten uit de proef kunnen worden gehaald. Bij het EAM model beoordelen we de ratten in de periode 14-25 dagen na inductie van EAM twee maal per dag. Hierdoor verwachten we dat er geen dieren langer dan een halve dag ernstig ongerief zullen hebben.

Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt. Het experiment waarin we kijken naar de mortaliteit onder de ratten ten gevolge van EAM voeren we pas uit nadat we in een kleinere groep ratten hebben geconstateerd dat EAM ook voor ontsteking in de atria zorgt.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

Er is op pubmed gezocht naar artikelen die gebruik maken van deze modellen. De uitvals-bepaling (percentage dieren dat uitvalt) voor het EAM model is al eerder uitgevoerd. Deze bepaling herhalen we in dit pilotexperiment omdat een eerder onderzoek door een andere groep geen garantie biedt dat uitval bij ons hetzelfde zal verlopen.

Daarnaast is er direct contact geweest met twee onderzoeksgroepen die ook met het EAM model hebben gewerkt, en die gezamenlijk in het verleden het bovengenoemde onderzoek hebben uitgevoerd waarin de uitval van ratten na inductie van EAM beschreven staat. (Center for Cardiovascular Research, Charité-University, Berlijn + Institute of Pathophysiology, Comenius University, Bratislava) Beide groepen hebben nooit naar de atria gekeken.

## 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.

De eerste drie dagen na inductie van EAM zullen de ratten wat pijn in de poot hebben ten gevolge van de injectie die ze in de poot krijgen. Doordat de pijn niet ernstig is, vinden wij het gebruik van zware pijnstillers (opiaten) niet verantwoord, gezien deze ook bijwerkingen veroorzaken. Lichtere pijnstillers (NSAIDs) vinden wij binnen ontstekingsmodellen ook geen goede optie, gezien deze een effect hebben op de ontstekingsrespons.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Acute virale myocarditis:

1. In de eerste week na inductie van acute virale myocarditis worden de muizen ziek. Waarschijnlijk is dit vrij mild. Hierbij is er alleen voor een periode van 3 dagen een lichte gewichtsdip en vertonen de muizen vrijwel geen uiterlijke kenmerken van ongerief. Er bestaat een kleine mogelijkheid dat de muizen een ernstiger ziekteverloop krijgen, met een grotere gewichtsdip en duidelijke kenmerken van ongerief (pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug).
2. De muizen ondervinden een kort moment van stress bij het inspuiten van het virus.



EAM:

1. De eerste drie dagen na inductie van EAM hebben de ratten matig ongerief ten gevolge van de reactie op het geïnjecteerde varkens-mynosine + CFA, met een gewichtsdip en subtiele tekenen van ongerief (minder activiteit en pilo-erectie). Het pootje waarin is geïnjecteerd zal iets opzwellen, waardoor de ratten dit pootje minder goed kunnen gebruiken.
2. Een deel (naar verwachting 20-25%) van de ratten zal tussen dag 18 en 21 na inductie EAM ernstig ziek worden (gewichtsverlies, pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en zal dan uit de proef worden genomen. Verwacht wordt dat dit vrij abrupt optreedt, waardoor de ratten hier maximaal een halve dag last van zullen hebben.
3. De ratten zullen eenmalig ontwaken uit anesthesie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Acute Virale Myocarditis:

1. Ontstekingsrespons ten gevolge van de injectie van het virus.
2. Fixeren muizen in combinatie met een intraperitoneale injectie.

EAM:

1. Ontstekingsrespons en zwelling ten gevolge van de injectie van de varkens-mynosine + CFA.
2. Ontsteking en necrose in het hart.
3. Ontwaken uit anesthesie, wat we toepassen om de injectie in de poot te kunnen zetten.

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

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief. We verwachten dat ratten die een humaan eindpunt bereiken (erstig ongerief) dit doen in de periode van 18-21 dagen na de inductie van EAM. Echter weten wij dit niet helemaal zeker, en voor de zekerheid controleren we daarom in de periode 14-25 dagen na de inductie van EAM de dieren twee maal per dag. Door in deze periode twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal. Om de zwelling van de pootjes bij het EAM model te beperken (punt 3) spuiten we een zo'n klein mogelijk volume in.

## 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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er **ernstig** ongerief wordt geconstateerd bij een dier. Het ongerief beoordelen we volgens onderstaande criteria:

Geen uiterlijke kenmerken van ongerief = **geen** of **licht** ongerief.

Milde uiterlijke kenmerken van ongerief (doffe vacht en afname van activiteit) met een gewichtsafname <20% ten opzichte van het startgewicht = **matig** ongerief.

Ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief (dichtgeknepen oogjes, gebolde rug, afwezigheid van activiteit en piloerectie) en/of een gewichtsafname >20% ten opzichte van het startgewicht = **ernstig** ongerief.

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

In theorie heeft elk proefdier kans om een humaan eindpunt te halen. Voor de muizen met acute virale myocarditis schatten wij de kans echter als vrij laag. In de groep ratten waarbij we de uitval door bereiken van een humaan eindpunt gaan beoordelen schatten wij de kans op 20-25% in. Voor overige ratten (die eerst gebruikt worden om te kijken of we bij de EAM-ratten atriale ontsteking kunnen induceren) is de kans ook vrij laag (<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.

### Acute virale myocarditis:

Cumulatief ongerief: Matig

### EAM:

Cumulatief ongerief: Matig, met verwacht ernstig ongerief bij circa 10-14% (3-4 ratten) van het totale aantal ratten (29 ratten):

- Maximaal 15 ratten zullen in proef blijven tot dag 18 na inductie van EAM. Deze ratten ondervinden matig ongerief, en we verwachten van geen van deze ratten dat het ongerief oploopt tot ernstig.
- 14 ratten blijven in proef tot en met dag 42 na inductie EAM. Voor deze groep verwachten we dat 20-25% (3-4 ratten) ernstig ongerief krijgt in de periode 18-21 dagen na inductie EAM. De overige ratten krijgen matig ongerief.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Vanwege het hartweefsel dat wij nodig hebben voor de analyses zullen de muizen en ratten getermineerd moeten worden.

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.

X 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

|     |                                                  |                    |                                          |
|-----|--------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 11400              |                                          |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | VU medisch centrum |                                          |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer         | Type dierproef                           |
|     |                                                  | 2                  | Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) |

*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.

Het hoofdexperiment bestaat uit twee onderdelen (zie ook schema in projectvoorstel 1.2.2). Eerst wordt de ontstekingsrespons in de atria in kaart gebracht (**deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking**), en vervolgens worden er analyses uitgevoerd voor het vaststellen en valideren van biomarkers voor atriale ontsteking (**deel 2: Biomarkers**)

#### **Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:**

Deel 1 wordt voor beide myocarditis-modellen (acute virale myocarditis en EAM) apart uitgevoerd, indien bij het betreffende model in het pilotexperiment is aangetoond dat er atriale ontsteking optreedt.

Voor zowel acute virale myocarditis als EAM is de proefopzet vergelijkbaar. Op meerdere tijdstippen na inductie van de myocarditis worden de dieren getermineerd en wordt hartweefsel weefsels en bloed uitgenomen. In het hartweefsel en bloed worden ontstekingsmarkers kwantitatief gemeten. Ook wordt gekeken naar remodeling (fibrose), wat optreedt in de atria na de ontstekingsrespons. Ook wordt vlak voor de terminatie gekeken naar de hartfunctie aan de hand van een electrocardiogram (ECG). Hiermee willen we beoordelen of de muizen en ratten spontaan atriumfibrilleren ontwikkelen door de ontsteking en daaropvolgende remodeling. In het geval van acute virale myocarditis wordt ook de hoeveelheid virus gemeten in de atria.

Uitkomstparameters voor alle tijdstippen:

- Hoeveelheid ontsteking (gemeten in hartweefsel en bloed)
- Hoeveelheid remodeling (fibrose)
- Hartfunctie (wel/geen afwijkingen op ECG)

- Aanwezigheid virus (alleen bij acute virale myocarditis)

### **Deel 2: Biomarkers:**

In dit experiment wordt gezocht naar potentiële biomarkers die verhoogd of verlaagd tot expressie komen bij atriale ontsteking. Hiervoor voeren wij voor beide modellen systematische gen/eiwit expressie analyses (bijvoorbeeld een microarray of proteomics analyse) uit op hartweefsel en bloed van controle muizen/ratten, muizen/ratten met atriale ontsteking en muizen/ratten waarbij ontstekingsfase al is afgelopen en de herstel/remodeling fase aan de gang is (fibrose). De optimale tijdstippen na de inductie van EAM of acute virale myocarditis die we hiervoor gebruiken baseren wij op bevindingen van deel 1.

Van potentieel interessante genen/eiwitten die uit deze analyses naar voren komen voeren wij daarna voor zowel het EAM model als acute virale myocarditis model een validatie-experiment uit waarbij we het atriaal hartweefsel en bloed analyseren met gen/eiwit specifieke analyses (bijvoorbeeld een qPCR of ELISA). Dit doen wij voor dezelfde drie groepen/tijdstippen: controle muizen/ratten, muizen/ratten met atriale ontsteking en muizen/ratten waarbij ontstekingsfase al is afgelopen en de herstelfase aan de gang is (fibrose)

Primaire uitkomstparameters:

- Verhoging of verlaging gen/eiwit expressies in hartweefsel en bloed.

---

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 muizen krijgen eenmalig een injectie (i.p.) met 100.000 partikels coxsackievirus B3. Van de dosis en wijze van toediening weten we uit eerdere ervaringen dat in vrijwel alle muizen een identiek ziektebeeld en myocarditis veroorzaakt.

De ratten krijgen, onder anesthesie, eenmalig een injectie in de poot om de EAM op te wekken, met hierin een mix van varkens-mycosine en Complete Freund's Adjuvant (CFA). Wij hebben contact met een onderzoeksgroep dat ervaring heeft met het EAM model. Uit onderzoek van deze groep is gebleken dat het injecteren van deze mix in de poot de beste methode is om EAM op te wekken.

### **Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:**

Er wordt bij alle dieren eenmalig (vlak voor de anesthesie behorend bij de terminatie) een ECG-meting gedaan door de dieren in een zogeheten ECG-tunnel te plaatsen. Tijdens de anesthesie waarin de dieren ook worden getermineerd wordt er bloed afgenomen.

---

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

---

De groepsgroottes worden gebaseerd op onze eerdere ervaringen met acute virale myocarditis modellen. Hiervan weten we dat de groepen groot genoeg zijn om significante verschillen aan te kunnen tonen (gebaseerd op ontsteking in de ventrikels), maar niet dusdanig groot dat er muizen worden 'verspild'.

### **Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:**

Verder beperken we de hoeveelheid groepen tot het minimale aantal dat nodig is om de ontstekings- en herstelrespons in kaart te brengen. We weten al uit eerdere ervaringen met C3H muizen dat op het moment dat de herstelrespons in gang treedt, het virus al is ge-elimineert. Hierdoor zullen we voor de latere tijdstippen geen C3H muizen gebruiken voor een analyse naar de hoeveelheid virus in de atria.

Voor het EAM model kunnen we met informatie uit het pilotexperiment een inschatting maken over de hoeveelheid ratten die per groep nodig zijn om statistische verschillen te kunnen aantonen (in verband met uitval). Het materiaal van de ratten uit het pilotexperiment die zijn gebruikt voor het inschatten van het uitval zullen ook gebruikt worden voor het in kaart brengen van de ontstekingsrespons. Hierdoor hoeven we voor het tijdstip dat deze ratten zijn getermineerd niet opnieuw een groep ratten op te voeren.

## **Deel 2: Biomarkers:**

Voor het EAM model kunnen we met informatie uit het pilotexperiment en deel 1 een inschatting maken over de hoeveelheid ratten die per groep nodig zijn om statische verschillen te kunnen aantonen.

De biomarker-analyses voeren we niet uit voor alle tijdstippen van deel 1. Het aantal meegenomen tijdstippen voor de analyses (twee tijdstippen plus een controle groep) is het minimale aantal dat nodig is om geschikte biomarkers te vinden.

## **B. De dieren**

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

Voor zowel het acute virale myocarditis model als het EAM model maken wij gebruik van mannelijke dieren. De reden hiervoor is dat in beide modellen mannetjes veel gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis dan vrouwtjes (*Frisancho-Kiss et al. Brain Res 2006;1126:139-147*). Omdat deze modellen minder goed werken in vrouwelijke dieren, zijn wij niet van mening dat het op dit punt al zinvol is om een onderscheid te maken tussen mannetjes en vrouwtjes. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap wordt gemaakt naar onderzoek bij patiënten.

## **Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:**

### **Acute virale myocarditis:**

**Diersoort:** C3H muizen. Dit is de muizenstam waarmee wij al ervaring hebben voor acute virale myocarditis.

**Herkomst:** Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

**Geschatte aantallen:** maximaal 130 dieren.

Zeven tijdstippen waarop muizen getermineerd worden plus een controle groep, elk met maximaal 10 muizen ( $8 \times 10 = 80$ ):

- dag 4 (begin ontstekingsrespons)
- dag 7 (piek innate immuunrespons)
- dag 10 (piek adaptive immuunrespons)
- dag 14 (virus geëlimineerd)
- dag 21 (begin remodeling fase)
- dag 35 (remodeling fase)
- dag 49 (late remodeling fase)

Dit tijdsframe is gebaseerd op kennis van acute virale myocarditis in de ventrikels van de muis

Voor de eerste vijf tijdstippen worden hier boven op maximaal 10 andere muizen gebruikt voor bepaling van de hoeveelheid virus in de atria ( $80 + 50 = 130$ ). Deze analyse gebeurt in ingevroren weefsel en kan daarom niet worden uitgevoerd op dezelfde muizen als waarin we kijken naar ontsteking en remodeling (waarvoor we formaldehyde-gefixeerd weefsel gebruiken). Van deze groepsgrootte (10 per groep) weten we vanuit eerdere ervaringen met het model dat het voldoende is om significante verschillen aan te tonen.

**Levensstadia:** 4 of 5 weken oud bij inductie acute myocarditis, afhankelijk van de uitkomsten van het pilotexperiment.

### **EAM:**

**Diersoort:** Lewis ratten. Dit is wereldwijd de meest gebruikte ratten-stam voor EAM modellen, en is ook de stam die gebruikt wordt met de onderzoeksgroep met wie wij contact hebben over het opzetten van dit model.

**Herkomst:** Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

**Geschatte aantallen:** maximaal 94 dieren.

zeven tijdstippen, elk met maximaal 14 ratten ( $7 \times 14 = 98$ ). Voor één van de zeven tijdstippen (dag 42) gebruiken we de groep ratten die ook al zijn opgevoerd in het pilotexperiment om de uitval van ratten te

bepalen. ( $98-14=84$ ). Tenslotte nemen we een controle groep mee van 10 ratten ( $84+10=94$ ):

- dag 7 (pre-ontsteking) = **maximaal 14 ratten**
- dag 10 (begin ontstekingsrepons) = **maximaal 14 ratten**
- dag 14 (vroeg ontsteking) = **maximaal 14 ratten**
- dag 21 (Piek ontsteking) = **maximaal 14 ratten**
- dag 28 (late ontsteking, vroege remodeling) = **maximaal 14 ratten**
- dag 42 (remodeling fase) = (pilotexperiment)
- dag 56 (late remodeling fase) = **maximaal 14 ratten**
- controle = **10 ratten**

**Totaal = maximaal 94 ratten**

Dit tijdsframe is gebaseerd op kennis van EAM in de ventrikels van de rat

Het maximum van 94 is het aantal dieren dat we nodig hebben voor de analyses (10), plus het aantal dieren dat we door het bereiken van een humaan eindpunt uit proef moeten halen (0 tot maximaal 4, wordt per tijdstip apart bepaald). Met de informatie uit het pilotexperiment weten we hoeveel ratten er zullen uitvallen, en op welke tijdstipen we dit uitval kunnen verwachten. Hiermee zal het uiteindelijke aantal ratten dat we per tijdstip nodig hebben worden bepaald.

Dit aantal van 10 ratten per groep voor analyse is gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen met dit model, waaruit blijkt dat groepen van 10 voldoende zijn om significante verschillen te kunnen aantonen op ontstekingsfactoren.

**Levensstadia:** circa 7 weken oud bij inductie EAM. De groep waarmee we contact hebben over dit model hanteert deze leeftijd.

## **Deel 2: Biomarkers:**

### **Acute virale myocarditis:**

**Diersoort:** C3H muizen. Dit is de muizenstam waarmee wij al ervaring hebben voor acute virale myocarditis.

**Herkomst:** Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

**Geschatte aantallen:** maximaal 66 dieren.

Twee tijdstipen plus een controle groep, elk met maximaal 10 muizen ( $3 \times 10 = 30$ ), voor zowel de systematische analyse als de daaropvolgende validatie-experiment ( $2 \times 30 = 60$ ) Voor gen-expressie in de atria van de muizen schatten we in dat de spreiding vergelijkbaar zal zijn als de spreiding van de hoeveelheid ontsteking, waardoor we voor deze muizen ook groepen van 10 aanhouden.

Van deze groepsgrootte (10 per groep) weten we vanuit eerdere ervaringen met het model dat het voldoende is om significante verschillen aan te tonen.

Bovenstaande berekening van het aantal proefdieren (60 dieren in totaal) gaat uit van 10 muizen voor de analyse. Als we constateren in deel 1 dat de spreiding van ontsteking in de atria dusdanig groot is dat 10 muizen per groep niet meer voldoende geschat wordt om significante verschillen te vinden (dit achten wij niet waarschijnlijk), worden de groepen voor het validatie-experiment uitgebreid tot maximaal 12 per groep. In dit geval zullen we maximaal 6 muizen extra nodig hebben (2 extra voor elk van de drie muizen-groepen), waarmee het totale aantal muizen zal uitkomen op maximaal 66 dieren.

**Levensstadia:** 4 of 5 weken oud bij inductie acute myocarditis, afhankelijk van de uitkomsten van het pilotexperiment

### **EAM:**

**Diersoort:** Lewis ratten. Dit is wereldwijd de meest gebruikte ratten-stam voor EAM modellen, en is ook de stam die gebruikt wordt met de onderzoeksgroep met wie wij contact hebben over het opzetten van dit

model.

**Herkomst:** Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

**Geschatte aantallen:** maximaal 82 dieren.

Twee tijdstippen, elk met maximaal 14 ratten plus een controle groep van 10 ratten ( $14+14+10 = 38$ ), en dit voor zowel de systemische biomarker analyse als het daaropvolgende validatie-experiment ( $2 \times 38 = 76$ ).

We voeren dit validatie-experiment uit op een nieuwe groep ratten omdat het materiaal dat overblijft na de systematische biomarker analyse niet voldoende is om een validatie-experiment op uit te voeren.

Voor het uitvoeren van de systemische analyse of hartweefsel en eiwit zijn 10 ratten per tijdstip nodig, evenals voor de ratten waarin we vervolgens de gevonden biomarkers gaan valideren (net zoals bij de muizen schatten we de spreiding van genen/eiwitten in de atria/ het bloed vergelijkbaar in als de hoeveelheid ontsteking). Voor de ratten waarbij EAM wordt geïnduceerd wordt eventueel maximaal 4 extra ratten meegenomen om te compenseren voor uitval ( $10+4=14$ ). Dit wordt bepaald aan de hand van de uitkomsten van het pilotexperiment.

Het aantal van 10 ratten per groep voor analyse is gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen met dit model, waaruit dat blijkt dat groepen van 10 voldoende zijn om significante verschillen te kunnen aantonen op ontstekingsfactoren.

Bovenstaande berekening van het aantal proefdieren (76 dieren in totaal) gaat uit van 10 ratten voor de analyse. Als we constateren in deel 1 dat de spreiding van ontsteking in de atria dusdanig groot is dat 10 ratten per groep niet meer voldoende geschat wordt om significante verschillen te vinden (dit achten wij niet waarschijnlijk), worden de groepen voor het validatie-experiment uitgebreid tot maximaal 12 per groep. In dit geval zullen we maximaal 6 ratten extra nodig hebben voor het validatie-experiment (2 extra voor elk van de drie groepen ratten), waarmee het totale aantal ratten zal uitkomen op maximaal 82 dieren.

**Levensstadia:** circa 7 weken oud bij inductie EAM. De groep waarmee we contact hebben over dit model hanteert deze leeftijd.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### Vervanging:

Ontstekingsreacties zijn complexe entiteiten waar meerdere orgaansystemen bij betrokken zijn. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsresponsen na bootsen met in vitro of ex vivo technieken.

Ook is het niet mogelijk dit onderzoek uit te voeren met patiënten.

De patiëntengroep waar de bevindingen uit deze studie uiteindelijk naar wordt geëxtrapoleerd zijn patiënten bij wie myocarditis wordt gediagnosticeerd. Bij deze patiënten worden geen ingrepen uitgevoerd waarbij we aan weefsel uit de atria kunnen komen.

Bij deze patiënten kunnen we dus niet een biomarker vinden in het bloed wat gecorreleerd kan worden aan ontsteking in de atria. Er zijn wel twee andere patiëntengroepen waarbij het mogelijk is om aan zowel atriaal weefsel als bloed van dezelfde patiënt te komen. Dit zijn enerzijds patiënten met atrium fibrilleren waarbij operatief een deel van het atrium wordt verwijderd, en anderzijds patiënten die voor een bypass/klep operatie aan een hart-longmachine worden gekoppeld.

Echter, omdat elke patiënt qua leeftijd, medische geschiedenis en genetische achtergrond vrijwel uniek is zou je per patiënt apart een systematische weefselanalyse (bijvoorbeeld een RNAseq analyse) moeten uitvoeren en een immunohistochemische analyse om te bepalen hoeveel ontsteking de patiënt heeft in de atria. Dit is niet haalbaar met de hoeveelheid weefsel dat per patiënt wordt uitgenomen. Bovendien heeft myocarditis een zeer karakteristiek ontstekingspatroon. Patiënten die een hartoperatie ondergaan kunnen ontsteking in de atria hebben, maar dit is hierdoor niet goed te extrapoleren naar de ontstekingsrespons van myocarditis patiënten. De myocarditis diermodellen beschreven in deze aanvraag hebben wel een vergelijkbaar ontstekingspatroon als bij myocarditis patiënten. Ten slotte kunnen we van deze patiënten geen ventrikel-weefsel analyseren. Dit is essentieel, omdat om een biomarker te vinden dat specifiek is voor ontsteking in de atria, we ook moeten weten of deze biomarker tot expressie komt in de ventrikels.

### **Vermindering:**

De groepsgroottes worden gebaseerd op onze eerdere ervaringen met acute virale myocarditis modellen, en ervaringen van andere groepen die het EAM model hebben gebruikt. Hiervan weten we dat de groepen groot genoeg zijn om significante verschillen aan te kunnen tonen, maar niet dusdanig groot dat er muizen/ratten worden 'verspild'. Omdat we momenteel niet precies weten wat de spreiding is van ontsteking in de atria voor beide modellen zijn de aantallen genoemd in deze bijlage een benadering. De daadwerkelijke hoeveelheid dieren die we nodig hebben voor de biomarkeranalyses zal worden bepaald aan de hand van de pilotexperimenten en deel 1 van het hoofdexperiment.

Doordat we EAM induceren door injectie in de poot ontwikkelt 100% van de ratten EAM. Hierdoor hoeven we geen extra dieren op te voeren om hiervoor te compenseren.

### **Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:**

Verder beperken we de hoeveelheid groepen tot het minimale aantal dat nodig is om de ontstekings- en herstelrespons in kaart te brengen. We weten al uit eerdere ervaringen met C3H muizen dat op het moment dat de herstelrespons in gang treedt, het virus al is ge-elimineert. Hierdoor zullen we voor de latere tijdstippen geen C3H muizen gebruiken voor een analyse naar de hoeveelheid virus in de atria.

Het materiaal van de ratten uit het pilotexperiment die zijn gebruikt voor het inschatten van de uitval zullen ook gebruikt worden voor het in kaart brengen van de ontstekingsrespons. Hierdoor hoeven we voor het tijdstip dat deze ratten zijn getermineerd niet opnieuw een groep ratten op te voeren. Doordat we EAM induceren door injectie in de poot ontwikkelt 100% van de ratten EAM. Hierdoor hoeven we geen extra dieren op te voeren om hiervoor te compenseren.

### **Deel 2: Biomarkers:**

De biomarker-analyses voeren we niet uit voor alle tijdstippen van deel 1. Het aantal meegenomen tijdstippen voor de analyses (twee tijdstippen plus een controle groep) is het minimale aantal dat nodig is om geschikte biomarkers te vinden.

### **Verfijning:**

In deze studie maken we gebruik van de C3H muizenstam. Deze muizenstam heeft de eigenschap dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt in vergelijking met andere muizenstammen, waardoor de muizen relatief weinig ongerief zullen hebben. Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt.

### **Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:**

Hartfunctie (ECG) meten we met behulp van een ECG-tunnel: ([http://ecg.emka.fr/5-emka\\_technologies\\_ecgtunnel\\_for\\_rodents-3.html](http://ecg.emka.fr/5-emka_technologies_ecgtunnel_for_rodents-3.html)) Hierbij worden de dieren (wakker) in een buis geplaatst, die vervolgens een ECG van de dieren maakt. Dit heeft het voordeel boven conventionele ECG-apparatuur (wat gebruikt maakt van invasieve electrodes) dat hiervoor de dieren niet onder anesthesie hoeven worden



gebracht. Hierdoor kunnen we ECG-metingen uitvoeren met minimaal ongerief voor de muizen en ratten.

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.

Om het ongerief voor de dieren te beperken worden de dieren gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden (temperatuur, lichtintensiteit en 12:12 uur dag:nacht cyclus). Ook krijgen de dieren na binnenkomst in het proefdiercentrum minimaal een week om te acclimatiseren.

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten snel uit proef kunnen worden gehaald. Bij het EAM model beoordelen we de ratten in de risicoperiode (periode waarin verwacht wordt dat 20-25% van de dieren uitvalt: 18-21 dagen na inductie EAM) twee maal per dag. (18-21 dagen is een voorlopige inschatting, en zal eventueel worden bijgesteld aan de hand van onze observaties in het pilotexperiment).

Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Er is op pubmed gezocht naar artikelen die gebruik maken van dit model. Wij hebben geen publicaties gevonden waarbij deze experimenten al eerder zijn uitgevoerd.

Daarnaast is er contact geweest met twee onderzoeksgroepen die ook met het EAM model hebben gewerkt in het verleden, en beide groepen hebben nooit naar de atria gekeken. (Center for Cardiovascular Research, Charité-University, Berlijn + Institute of Pathophysiology, Comenius University, Bratislava)

## 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.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De eerste drie dagen na inductie van EAM zullen de ratten wat pijn in de poot hebben ten gevolge van de injectie die ze in de poot krijgen. Doordat de pijn niet ernstig is, vinden wij het gebruik van zware pijnstillers (opiaten) niet verantwoord, gezien deze ook bijwerkingen veroorzaken. Lichtere pijnstillers (NSAIDs) vinden wij binnen ontstekingsmodellen ook geen goede optie, gezien deze een effect hebben op de ontstekingsrespons.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Acute virale myocarditis:

1. In de eerste week na inductie van acute virale myocarditis worden de muizen ziek. Dit ziekteverloop is vrij mild. Hierbij is er alleen voor een periode van 3 dagen een lichte gewichtsdip en vertonen de muizen vrijwel geen uiterlijke kenmerken van ongerief.
2. De muizen krijgen een kort moment van stress bij het inspuiten van het virus.

Alleen in deel 1:

3. Alle muizen ondergaan een ECG-meting, wat een beetje stress kan opleveren.

EAM:

1. De eerste drie dagen na inductie van EAM hebben de ratten matig ongerief ten gevolge van de reactie op het geïnjecteerde varkens-mynosine + CFA, met een gewichtsdip en subtiele tekenen van ongerief (minder activiteit en pilo-erectie). Het pootje waarin is geïnjecteerd zal iets opzwellen, waardoor de ratten dit pootje minder goed kunnen gebruiken.
2. Een deel van de ratten (naar verwachting 20-25%) zal tussen dag 18 en 21 na inductie EAM ernstig ziek worden (gewichtsverlies, pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en uit proef worden genomen. Verwacht wordt dat dit vrij abrupt optreedt, waardoor de ratten hier maximaal een dag last van zullen hebben.
3. De ratten zullen eenmalig ontwaken uit anesthesie.

Alleen in deel 1:

4. Alle ratten ondergaan een ECG-meting, wat een beetje stress kan opleveren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Acute virale myocarditis:

1. Ontstekingsrespons ten gevolge van de injectie van het virus.
2. Fixeren muizen in combinatie met een intraperitoneale injectie.
3. De dieren worden kort opgesloten in een ECG-tunnel, wat de bewegingsvrijheid beperkt.

EAM:

1. Ontstekingsrespons en zwelling ten gevolge van de injectie van de varkens-mynosine + CFA.
2. Ontsteking en necrose in het hart.
3. Ontwaken uit anesthesie, wat we toepassen om de injectie in de poot te kunnen zetten.
4. De dieren worden kort opgesloten in een ECG-tunnel, wat de bewegingsvrijheid beperkt.

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

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten meteen uit de proef kunnen worden gehaald. Bij het EAM model beoordelen we de ratten in de periode waarin we in het pilotexperiment hebben geconstateerd dat er bij dieren ernstig ongerief optreedt twee maal per dag. Om de zwelling van de pootjes bij het EAM model te beperken (punt 3) spuiten we een zo'n klein mogelijk volume in.

#### 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.

Een humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er **ernstig** ongerief wordt geconstateerd bij een dier. Het ongerief beoordelen we volgens onderstaande criteria:

Geen uiterlijke kenmerken van ongerief = **geen** of **licht** ongerief.

Milde uiterlijke kenmerken van ongerief (doffe vacht en afname van activiteit) met een gewichtsafname <20% ten opzichte van het startgewicht = **matig** ongerief.

Ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief (dichtgeknepen oogjes, gebolde rug, afwezigheid van activiteit en piloerectie) en/of een gewichtsafname >20% ten opzichte van het startgewicht = **ernstig** ongerief.

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

In theorie heeft elk proefdier kans om een humaan eindpunt te halen. Voor de muizen met acute virale myocarditis schatten wij de kans vrij laag (<5%). We schatten dat van de dieren die langer dan 18 dagen in proef zullen zitten na inductie van EAM de kans 20-25% is dat een humaan eindpunt bereikt. Voor de overige ratten is de kans vrij laag (<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.

##### Acute virale myocarditis:

Cumulatief ongerief: Matig

##### EAM:

Cumulatief ongerief: Matig, met verwacht ernstig ongerief bij circa 16% (circa 26 dieren) van het totale aantal ratten (circa 164 dieren).

We verwachten dat voor alle dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (102 dieren) er 25% ernstig ongerief zullen krijgen (circa 26 dieren). Alle overige ratten hebben matig ongerief.

Dit is een voorlopige inschatting, gebaseerd op de kennis die wij hebben vanuit andere groepen die met het EAM model hebben gewerkt. Het aantal ratten in deze berekening komt niet overeen met de aantallen genoemd in onderdeel B, omdat die aantallen uitgaan van een eventueel hogere uitval (maximale aantallen).

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Vanwege het hartweefsel en bloed dat wij nodig hebben voor de analyses zullen de muizen en ratten getermineerd moeten worden

|                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?          |
| <input type="checkbox"/> Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor. |
|                                                                                               |
| X Ja                                                                                          |

# DEC-advies

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

2. Titel van het project:

*Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis*

3. Titel van de NTS:

*Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis*

4. Type aanvraag:

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

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
- mailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ☒ *ontvangen door DEC: 26-11-2015*
- ☒ *aanvraag compleet: 26-11-2015*
- ☒ *in vergadering besproken: 8-12-2015*
- ☐ *anderszins behandeld: n.v.t.*
- ☐ *termijnonderbreking(en) van / tot: n.v.t.*
- ☐ *besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.*
- ☒ *aanpassing aanvraag: n.v.t.*
- ☒ *advies aan CCD: 11-04-2016*

7. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: *14-12-2015, 20-1-2016, 2-2-2016 en 22-02-2016*
- Strekking van de vraag / vragen:

*NTS is nog slordig, moet netter en er staan meerder spellingsfouten in de aanvraag. Men moet meer vertellen over de translatie naar de humane situatie. Het wetenschappelijk belang beter toelichten/onderbouwen en de strategie aanpassen. Waarom gebruikt men 2 verschillende modellen?*

*Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels.*

- Datum antwoord: 30-12-2015, 27-1-2016, 15-02-2016 en 09-03-2016
- Strekking van het (de) antwoord(en):  
*De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja*

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

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

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: één van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project en is niet betrokken geweest bij de advisering.*

## **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 doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

*Myocarditis is een ontstekingsziekte van het myocard ofwel de hartspier. Een veel voorkomende complicatie bij myocarditis patiënten is het ontstaan van atriumfibrilleren (boezemhartritmestoornis). Dit kan grote gevolgen hebben voor de patiënt, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte.*

*Dit onderzoeksproject heeft als doel het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis. Met dit onderzoek wil men diagnostische biomarkers in het bloed vinden die specifiek zijn voor deze atriale ontsteking.*

*Het uiteindelijke doel is om bij patiënten met myocarditis atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen. Myocarditis is een brede ziekte is met meerdere onderliggende mechanismen. Bij de meeste patiënten is myocarditis de oorzaak van een acute virale infectie of een auto immuunrespons. Daarom gebruikt men tijdens dit onderzoek twee diermodellen: Het autoimmuun myocarditis (EAM) model en het acute*

*virale myocarditismodel.*

3. *De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:*

*Het wetenschappelijk belang: Er is weinig bekend over het effect van myocarditis op de atria. Door de analyses die men gaat uitvoeren krijgt men meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis.*

*Het maatschappelijk belang:*

*Atriumfibrilleren is een zeer lastig te behandelen chronische aandoening wat ernstige gevolgen voor de patiënt kan hebben, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte. Myocarditis is een van de hartaandoeningen die kan leiden tot atriumfibrilleren.*

*Deze studie zal bijdragen aan de ontwikkeling van diagnostische biomarkers om atriale ontsteking in myocarditis patiënten te identificeren. Hiermee kan de gevoeligheid voor atriumfibrilleren worden opgespoord en daarna behandeld worden. Dit kan uiteindelijk leiden tot een verlaging van de incidentie van atriumfibrilleren en de daaraan gerelateerde morbiditeit en mortaliteit.*

*Hoewel er algemene biomarkers zijn die ontsteking kunnen aantonen, kunnen deze niet specifiek aan de atria (hartboezems) worden gekoppeld en zijn dus niet bruikbaar voor het specifiek diagnosticeren van atriale ontsteking. Daarom zijn er nieuwe biomarkers nodig, die wel specifiek zijn voor atriale ontsteking.*

4. *Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

*Deze eerder gevonden resultaten maken het aannemelijk dat de voorgestelde therapie een gunstig effect zal hebben. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren.*

*Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diermodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model) , omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkregen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. Voor beide modellen gebruikt men mannelijke dieren, omdat mannetjes gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap wordt gemaakt naar onderzoek bij patiënten.*

*De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project nieuwe en/of aanvullende inzichten en therapieën zullen worden ontwikkeld. De nieuw verkregen inzichten en*

*therapieën kunnen op termijn bij patiënten worden toegepast, wat de kansen op remissie en op uiteindelijke genezing doet toenemen. De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC een toetsbare eenheid.*

5. *Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.*
6. *Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het verwachte ongerief is over het algemeen matig in beide diermodellen (92%) en voor een klein deel van de dieren (max 8%) verwacht men ernstig ongerief.*

*Bij het acute virale myocarditis model wordt voor alle muizen maximaal matig ongerief verwacht.*

*Bij het EAM model wordt over het algemeen matig ongerief en in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat van alle ratten die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal ondervinden (circa 30 dieren). Voor de overige ratten wordt matig ongerief verwacht.*

*Onder ernstig ongerief vallen ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief en/of een gewichtsafname van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht. Een humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er ernstig ongerief wordt geconstateerd bij een dier, dan wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd.*

7. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de **vervanging** van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*Ontstekingsreacties zijn zeer complex, en meerdere orgaansystemen zijn bij dit proces betrokken. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsreacties na te bootsen met in vitro experimenten. Het onderzoek naar diagnostische markers voor atriale ontsteking kan niet bij mensen worden uitgevoerd, omdat het niet mogelijk is om bij levende myocarditis patiënten zonder atriumfibrilleren aan het weefsel van de atria (hartboezems) te komen.*

*In dit project wordt daarom gebruikt gemaakt van twee diermodellen, welke de meest frequent voorkomende vormen van myocarditis bij humane patiënten weergeven: autoimmuun myocarditis (EAM) model en acute virale myocarditismodel. Voor de eerste model wordt gebruik gemaakt van een ratmodel met autoimmuun myocarditis (EAM), voor het tweede model zijn geen geschikte rat-modellen, hier maakt men gebruik van een muismodel met acute coxsackievirus B3-geïnduceerde myocarditis. Beide diermodellen zijn goed beschreven en worden wereldwijd gebruikt voor myocarditis. Het toepassen van beide modellen is essentieel, zodat het onderzoek extrapoleerbaar is naar alle patiënten.*

8. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven.*

*Door gebruik te maken van een pilot experiment, het gefaseerd uitvoeren van de*



*experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het maximale aantal proefdieren, is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van 3 jaar. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 211 muizen en 205 ratten, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.*

*Men beperkt zich bij het meten tot de tijds punten waarbij de meeste ontsteking te zien is, hierdoor blijft het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten beperkt. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

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.*

*Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en diervverzorgers uitgevoerd en waar mogelijk wordt pijnstilling of verdoving toegepast. Om stress te voorkomen worden de dieren na acclimatisatie gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden.*

*De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd, eerst wordt een pilot gedaan, om ervoor te zorgen dat er zo weinig mogelijk dieren ernstig ongerief ondervinden. Wanneer er ernstig ongerief wordt geconstateerd is het humane eindpunt bereikt en wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd. De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten uit de proef kunnen worden gehaald.*

*Voor het acute virale myocarditis model gebruikt men een muizenstam die de eigenschap heeft dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt, waardoor de muizen maximaal matig ongerief zullen ervaren. Bij het EAM model zal maximaal 25% van de dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (circa 30 dieren) ernstig ongerief ondervinden. Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal. Tevens wordt er zo'n klein mogelijk volume ingespoten om de zwelling van de pootjes te beperken.*

*Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.*

10. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis.*

*Het verwachte resultaat, atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen bij patiënten met myocarditis, is afgewogen tegen het, overwegend matige en bij maximaal 30 ratten als ernstige ingeschatte ongerief, aantasting van integriteit en het doden van de dieren in de proef.*

*Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diermodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model) , omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkregen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.*

*Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Zowel het wetenschappelijke als het maatschappelijke belang worden door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere behandelingsmethoden voor patiënten.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn wordt behaald. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en het daarbij verwachte overwegend matige en bij maximaal 30 ratten ernstige ongerief.*

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ✓ *De DEC adviseert de vergunning te verlenen*

### 2. *Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheid.*

*Eén lid van de DEC maakt een andere afweging, gezien het mogelijk ernstig ongerief voor maximaal dertig dieren. Het lid vraagt zich af of dergelijk ongerief wel kan worden gerechtvaardigd. Lijden is wellicht voor een belangrijke mate diersoort onafhankelijk. Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, gaat dit lid niet mee in het positieve advies van de commissie.*

*Hoewel in dit project gebruik van een zwaar ziektemodel onvermijdelijk is, waarbij een belangrijk deel van de dieren mogelijk ernstig ongerief zal ondervinden, acht de DEC dat met het beschreven project belangrijk inzicht gevonden zal worden in het proces van atriale ontsteking bij myocarditis. Bovendien wordt in 2 verschillende modelsystemen naar dit proces gekeken (te weten; viraal en auto-immuun), wat de belangen verder vergroot. Met het behalen van de projectdoelen kunnen duidelijke stappen voorwaarts gezet worden in de ontwikkeling van mogelijke diagnostiek van deze ziekte in de kliniek. De meerderheid van de DEC vindt deze grote wetenschappelijke en maatschappelijke belangen in voldoende mate opwegen tegen de geschade dierenbelangen.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te  
Amsterdam



van der Boechhorststraat 1  
1081 BT AMSTERDAM



**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  
AVD114002016513  
**Bijlagen**  
2

Datum 11 april 2016  
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen  
op 11 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is  
AVD114002016513. 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](http://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: 11400

Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

[REDACTED]

KvK-nummer: 64156338

Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Afdeling crediteuren VU Medisch Centrum

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]

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 083547708  
Naam: [REDACTED]  
Adres: van der Boechhorststraat 1  
Postcode en plaats: 1081 BT AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging  
afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde  
doen?

- ☒ Een projectvergunning aanvragen
- ☒ Een wijziging op een verleende  
projectvergunning aanvragen
- ☒ Een melding doorgeven op een verleende  
projectvergunning
- ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren  
met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere  
handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede  
afwikkeling van het bezwaarschrift
- ☐ Alle bovenstaande opties

**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 juni 2016  
Geplande einddatum: 1 juni 2019  
Titel project: Het diagnosticeren en behandelen van artriale ontsteking bij myocarditis  
Titel niet-technische samenvatting: Het diagnosticeren en behandelen van artriale ontsteking bij myocarditis  
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum  
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam / Nederland  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.187,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen: [x] Projectvoorstel  
[x] Beschrijving Dierproeven  
[x] Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen: [x] Melding Machtiging  
[x] DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 11 april 2016





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te  
Amsterdam

van der Boechhorststraat 1  
1081 BT AMSTERDAM



**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  
AVD114002016513

**Bijlagen**

2

Datum 11 april 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 11 april 2016  
Vervaldatum: 11 mei 2016  
Factuurnummer: 16700513  
Ordernummer: Inkoopordernummer 4573361

| Omschrijving                                                                     | Bedrag     |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD114002016513 | € 1.187,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

De Boelelaan 1117  
1081 HV Amsterdam

**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**  
Aanvraagnummer  
AVD114002016513

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 4 mei 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" met aanvraagnummer AVD114002016513. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

**Onduidelijkheden**

1) Uw onderzoek begint met een pilot studie voor beide diersmodellen. Indien niet aan de voorwaarden wordt voldaan (voor AVM: atriale ontsteking en geen ernstig ongerief; voor EAM: atriale ontsteking) zal dit voor dit model een no-go zijn. Daarnaast beschrijft u dat het gebruik van 2 diersmodellen essentieel is omdat u alleen met beide modellen een compleet beeld kunt krijgen in hoeverre de gevonden biomarkers in deze studie extrapoleerbaar zijn naar de totale myocarditis populatie.

Kunt u verhelderen of en hoe u het project zult continueren indien uit de pilot van 1 van de modellen blijkt dat deze niet aan de gestelde voorwaarden voldoet? Indien slechts met 1 model kan worden doorgedaan, kunt u dan aangeven of het project dan nog voldoende zinvol is om door te gaan met dit ene model?

2) De inductie van EAM vindt plaats door injectie in het pootje. Gaat het hier om injectie in de voetzool of aan de bovenkant van het pootje. Indien het gaat om voetzoolimmunisatie, worden de dieren dan gehuisvest op extra dikke bedding (zoals is aangegeven in de Code of Practice voor immuniseren van proefdieren)?

**Datum**

4 mei 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD114002016513**Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- |              |        |
|--------------|--------|
| Naam         |        |
| Datum        | - - 20 |
| Handtekening |        |

*Hierbij de antwoorden op de vragen van de CCD bij het project “Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis” met aanvraagnummer AVD114002016513 naar aanleiding van uw brief op 4 mei 2015.*

*Vraag 1) Uw onderzoek begint met een pilot studie voor beide diermodellen. Indien niet aan de voorwaarden wordt voldaan (voor AVM: atriale ontsteking en geen ernstig ongerief; voor EAM: atriale ontsteking) zal dit voor dit model een no-go zijn. Daarnaast beschrijft u dat het gebruik van 2 diermodellen essentieel is omdat u alleen met beide modellen een compleet beeld kunt krijgen in hoeverre de gevonden biomarkers in deze studie extrapoleerbaar zijn naar de totale myocarditis populatie. Kunt u verhelderen of en hoe u het project zult continueren indien uit de pilot van 1 van de modellen blijkt dat deze niet aan de gestelde voorwaarden voldoet? Indien slechts met 1 model kan worden doorgegaan, kunt u dan aangeven of het project dan nog voldoende zinvol is om door te gaan met dit ene model?*

Antwoord vraag 1) Een mogelijk scenario na het uitvoeren van de pilotexperimenten voor beide modellen het resultaat is dat voor één van beide modellen aan de criteria wordt voldaan om te starten met het hoofdexperiment, maar voor het andere model niet. Met slechts één model is de verkregen informatie uit de experimenten inderdaad niet volledig extrapoleerbaar naar de complete myocarditis populatie. Dit zal echter voor ons geen reden zijn om de complete studie te stoppen. Als een van de myocarditis-modellen niet geschikt blijkt te zijn om onderzoek te doen naar atriale ontsteking, dan zullen wij op zoek gaan naar een vervangend model waarin we dit mogelijk wel kunnen onderzoeken. Dit zal dan via een addendum aan de CCD worden voorgelegd. In de tussentijd gaan wij wel verder met de experimenten voor het werkende model. Dat de informatie uit het andere model pas later wordt verkregen is hiervoor niet hinderlijk.

*Vraag 2) De inductie van EAM vindt plaats door injectie in het pootje. Gaat het hier om injectie in de voetzool of aan de bovenkant van het pootje. Indien het gaat om voetzoolimmunisatie, worden de dieren dan gehuisvest op extra dikke bedding (zoals is aangegeven in de Code of Practice voor immuniseren van proefdieren)?*

Antwoord vraag 2) De injectie zal worden gezet in de voetzool. We zullen de bedding van de kooien hierop aanpassen volgens de reglementen.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 25 april 2016 14:59  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Vragen over DEC advies AVD114002016513

10.

Beste DEC,

U heeft de CCD een advies gestuurd betreffende aanvraag AVD114002016513, "het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis".

Onze dank voor dit heldere en goed-onderbouwde advies. Wij hebben echter nog wel enkele vragen waarbij we graag nog een verheldering van u krijgen:

1) Citaat uit uw advies: *"Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels."*

U geeft hier aan dat er nog vragen zijn bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels. Verderop in uw advies gaat u hier niet meer op in. Waren deze vragen opgehelderd op het moment dat u het advies heeft gefinaliseerd of staan deze vragen nog open? In geval dat deze vragen nog open staan, welke vragen zijn dit dan nog?

2) U geeft aan dat het uitgebrachte advies niet door alle DEC leden wordt gesteund. U schrijft hierbij: *"Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, ...."* Het is ons niet geheel duidelijk wat hiermee bedoeld wordt. Kunt u dit verhelderen?

Graag zouden wij uiterlijk vrijdag 29 april een reactie op bovenstaande vragen ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
Centrale Commissie Dierproeven

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 28 april 2016 12:57  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** Re: Vragen over DEC advies AVD114002016513  
**Categorieën:** Dossier [REDACTED]

Geachte CCD,

Hierbij het antwoord van de DEC VU/VUmc op de vragen van de CCD over het DEC-advies betreffende aanvraag AVD114002016513.

Beste DEC,

U heeft de CCD een advies gestuurd betreffende aanvraag AVD114002016513, "het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis".

Onze dank voor dit heldere en goed-onderbouwde advies. Wij hebben echter nog wel enkele vragen waarbij we graag nog een verheldering van u krijgen:

1) Citaat uit uw advies: *"Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels."*

U geeft hier aan dat er nog vragen zijn bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels. Verderop in uw advies gaat u hier niet meer op in. Waren deze vragen opgehelderd op het moment dat u het advies heeft gefinaliseerd of staan deze vragen nog open? In geval dat deze vragen nog open staan, welke vragen zijn dit dan nog?

Antwoord punt 1: De formulering kon inderdaad wat nauwkeuriger. Na de eerste beantwoording van de vragen waren er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels, dat is in de laatste vraagronde hersteld. Daarbij zijn alle vragen opgehelderd voordat de DEC het DEC-advies had gefinaliseerd.

2) U geeft aan dat het uingebrachte advies niet door alle DEC leden wordt gesteund. U schrijft hierbij: *"Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, ...."* Het is ons niet geheel duidelijk wat hiermee bedoeld wordt. Kunt u dit verhelderen?

Antwoord punt 2:

In de aanvraag komt naar voren dat: *"Bij het EAM model wordt in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat alle dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal krijgen (circa 30 dieren)."* *"Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal."*

De meerderheid van de DEC commissie geeft een positief advies, hierbij heeft men het ernstige ongerief bij de dieren meegenomen in de afweging. Er is 1 DEC lid dat niet meegaat met dit advies, dit lid is van mening dat het ernstige ongerief bij de dieren niet opweegt tegen de belangen van het onderzoek. De IvD heeft de onderzoekers geadviseerd de dieren in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag te controleren, om zo het ernstige ongerief te beperken tot een minimum. Helaas is er geen mogelijkheid om ernstig ongerief geheel te voorkomen, ook niet door meerdere controles per dag (twee of meer) uit te voeren. Het DEC lid dat niet meegaat in het advies is van mening dat omdat het ernstige ongerief/lijd niet voorkomen kan worden (ook niet door de vastgestelde controle momenten) het belang van het onderzoek niet opweegt tegen het ongerief bij de dieren. De IvD zal er tijdens het opstellen van het werkprotocol en het uitvoeren van de experimenten streng op toe zien dat de humane eindpunten duidelijk worden vastgesteld en gehanteerd. Tevens zullen er extra controles plaatsvinden door de 13f functionaris in de gevallen waar kans is op ernstig ongerief.

De DEC VU/VUmc hoopt u op deze manier voldoende informatie te hebben gegeven, mocht er nog meer informatie/toelichting nodig zijn dan horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

■■■■■■■■■■ (namens de DEC VU/VUmc)





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

deBoelelaan1117  
1081 HV AMSTERDAM  
[Barcode]

**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  
AVD114002016513  
**Bijlagen**

1

23 MEI 2016

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 11 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" met aanvraagnummer AVD114002016513. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u informatie aangeleverd betreffende doorgang van het project indien één van beide diermodellen niet operationeel zou blijken. Daarnaast heeft u aangegeven de dieren die in de voetzool geïmmuniseerd worden op extra dikke bedding te huisvesten, conform de Code of Practice voor het immuniseren van proefdieren. Deze informatie was voldoende duidelijk en is in de afweging meegenomen.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De voorwaarde betreffende de afstemming van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in proeven te voorkomen.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2016 tot en met 1 juni 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1 sub d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage. Deze beoordeling achteraf dient plaats te vinden wegens potentieel ernstig ongerief voor een deel van de dieren.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 28 april 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Dit betrof verheldering van het DEC advies op het punt van het minderheidsstandpunt en op het punt van mogelijk onbeantwoorde vragen.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Het DEC advies is gebaseerd op een minderheidsstandpunt. De CCD heeft speciale aandacht besteed aan de overweging van het anders denkende DEC-lid. De verwachte opbrengst van het onderzoek rechtvaardigt naar het oordeel van de CCD het gebruik van dieren waarbij voor een deel van de dieren het ongerief ernstig zal zijn.

### **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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

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

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD114002016513

verschuldigd. Op  
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt  
u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven

na



**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: Vrije Universiteit Medisch Centrum  
Adres: de Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2016 tot en met 1 juni 2019, voor het project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" met aanvraagnummer AVD114002016513, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum, met toevoeging van algemene voorwaarden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Post-Doc.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 april 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 11 april 2016, ontvangen op 11 april 2016, aangevuld op 28 april 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 mei 2016.

| Naam proef                                  | Diersoort/ Stam                    | Aantal dieren | Ernst                          | Opmerkingen                                 |
|---------------------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------------------|
| 1. Pilotexperiment                          | Muizen (Mus musculus) / C3H        | 15            | 100%<br>Matig                  | Acute virale myocarditis model              |
| 1. Pilotexperiment                          | Ratten (Rattus norvegicus) / Lewis | 29            | 14%<br>Ernstig<br>86%<br>Matig | Experimentele auto-immuun myocarditis model |
| 2. Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) | Muizen (Mus musculus) / C3H        | 196           | 100%<br>Matig                  | Acute virale myocarditis model              |
| 2. Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) | Ratten (Rattus norvegicus) / Lewis | 176           | 16%<br>Ernstig<br>84%<br>Matig | Experimentele auto-immuun myocarditis model |

#### Voorwaarden

##### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2020 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

##### Algemene voorwaarden:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 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 blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

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

Uit artikel 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

#### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1 sub d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.



# DEC-advies

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

2. Titel van het project:

*Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis*

3. Titel van de NTS:

*Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis*

4. Type aanvraag:

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

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
- mailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ☒ *ontvangen door DEC: 26-11-2015*
- ☒ *aanvraag compleet: 26-11-2015*
- ☒ *in vergadering besproken: 8-12-2015*
- ☐ *anderszins behandeld: n.v.t.*
- ☐ *termijnonderbreking(en) van / tot: n.v.t.*
- ☐ *besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.*
- ☒ *aanpassing aanvraag: n.v.t.*
- ☒ *advies aan CCD: 11-04-2016*

7. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: *14-12-2015, 20-1-2016, 2-2-2016 en 22-02-2016*
- Strekking van de vraag / vragen:

*NTS is nog slordig, moet netter en er staan meerder spellingsfouten in de aanvraag. Men moet meer vertellen over de translatie naar de humane situatie. Het wetenschappelijk belang beter toelichten/onderbouwen en de strategie aanpassen. Waarom gebruikt men 2 verschillende modellen?*

*Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels.*



- Datum antwoord: 30-12-2015, 27-1-2016, 15-02-2016 en 09-03-2016
  - Strekking van het (de) antwoord(en):  
*De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja*
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): *n.v.t.*

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

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: één van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project en is niet betrokken geweest bij de advisering.*

## **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 doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

*Myocarditis is een ontstekingsziekte van het myocard ofwel de hartspier. Een veel voorkomende complicatie bij myocarditis patiënten is het ontstaan van atriumfibrilleren (boezemhartritmestoornis). Dit kan grote gevolgen hebben voor de patiënt, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte.*

*Dit onderzoeksproject heeft als doel het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis. Met dit onderzoek wil men diagnostische biomarkers in het bloed vinden die specifiek zijn voor deze atriale ontsteking.*

*Het uiteindelijke doel is om bij patiënten met myocarditis atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen. Myocarditis is een brede ziekte is met meerdere onderliggende mechanismen. Bij de meeste patiënten is myocarditis de oorzaak van een acute virale infectie of een auto immuunrespons. Daarom gebruikt men tijdens dit onderzoek twee diermodellen: Het autoimmuun myocarditis (EAM) model en het acute*

*virale myocarditismodel.*

3. *De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:*

*Het wetenschappelijk belang: Er is weinig bekend over het effect van myocarditis op de atria. Door de analyses die men gaat uitvoeren krijgt men meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis.*

*Het maatschappelijk belang:*

*Atriumfibrilleren is een zeer lastig te behandelen chronische aandoening wat ernstige gevolgen voor de patiënt kan hebben, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte. Myocarditis is een van de hartaandoeningen die kan leiden tot atriumfibrilleren.*

*Deze studie zal bijdragen aan de ontwikkeling van diagnostische biomarkers om atriale ontsteking in myocarditis patiënten te identificeren. Hiermee kan de gevoeligheid voor atriumfibrilleren worden opgespoord en daarna behandeld worden. Dit kan uiteindelijk leiden tot een verlaging van de incidentie van atriumfibrilleren en de daaraan gerelateerde morbiditeit en mortaliteit.*

*Hoewel er algemene biomarkers zijn die ontsteking kunnen aantonen, kunnen deze niet specifiek aan de atria (hartboezems) worden gekoppeld en zijn dus niet bruikbaar voor het specifiek diagnosticeren van atriale ontsteking. Daarom zijn er nieuwe biomarkers nodig, die wel specifiek zijn voor atriale ontsteking.*

4. *Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

*Deze eerder gevonden resultaten maken het aannemelijk dat de voorgestelde therapie een gunstig effect zal hebben. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren.*

*Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diermodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model) , omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkrijgen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. Voor beide modellen gebruikt men mannelijke dieren, omdat mannetjes gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap word gemaakt naar onderzoek bij patiënten.*

*De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project nieuwe en/of aanvullende inzichten en therapieën zullen worden ontwikkeld. De nieuw verkregen inzichten en*

*therapieën kunnen op termijn bij patiënten worden toegepast, wat de kansen op remissie en op uiteindelijke genezing doet toenemen. De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC een toetsbare eenheid.*

5. *Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.*
6. *Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het verwachte ongerief is over het algemeen matig in beide diermodellen (92%) en voor een klein deel van de dieren (max 8%) verwacht men ernstig ongerief.*

*Bij het acute virale myocarditis model wordt voor alle muizen maximaal matig ongerief verwacht.*

*Bij het EAM model wordt over het algemeen matig ongerief en in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat van alle ratten die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal ondervinden (circa 30 dieren). Voor de overige ratten wordt matig ongerief verwacht.*

*Onder ernstig ongerief vallen ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief en/of een gewichtsafname van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht. Een humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er ernstig ongerief wordt geconstateerd bij een dier, dan wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd.*

7. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de **vervanging** van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*Ontstekingsreacties zijn zeer complex, en meerdere orgaansystemen zijn bij dit proces betrokken. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsreacties na te bootsen met in vitro experimenten. Het onderzoek naar diagnostische markers voor atriale ontsteking kan niet bij mensen worden uitgevoerd, omdat het niet mogelijk is om bij levende myocarditis patiënten zonder atriumfibrilleren aan het weefsel van de atria (hartboezems) te komen.*

*In dit project wordt daarom gebruikt gemaakt van twee diermodellen, welke de meest frequent voorkomende vormen van myocarditis bij humane patiënten weergeven: autoimmuun myocarditis (EAM) model en acute virale myocarditismodel. Voor de eerste model wordt gebruik gemaakt van een ratmodel met autoimmuun myocarditis (EAM), voor het tweede model zijn geen geschikte rat-modellen, hier maakt men gebruik van een muismodel met acute coxsackievirus B3-geïnduceerde myocarditis. Beide diermodellen zijn goed beschreven en worden wereldwijd gebruikt voor myocarditis. Het toepassen van beide modellen is essentieel, zodat het onderzoek extrapoleerbaar is naar alle patiënten.*

8. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven.*

*Door gebruik te maken van een pilot experiment, het gefaseerd uitvoeren van de*

*experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het maximale aantal proefdieren, is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van 3 jaar. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 211 muizen en 205 ratten, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.*

*Men beperkt zich bij het meten tot de tijdstippen waarbij de meeste ontsteking te zien is, hierdoor blijft het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten beperkt. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

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.*

*Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en diervverzorgers uitgevoerd en waar mogelijk wordt pijnstilling of verdoving toegepast. Om stress te voorkomen worden de dieren na acclimatisatie gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden.*

*De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd, eerst wordt een pilot gedaan, om ervoor te zorgen dat er zo weinig mogelijk dieren ernstig ongerief ondervinden. Wanneer er ernstig ongerief wordt geconstateerd is het humane eindpunt bereikt en wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd. De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten uit de proef kunnen worden gehaald.*

*Voor het acute virale myocarditismodel gebruikt men een muizenstam die de eigenschap heeft dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt, waardoor de muizen maximaal matig ongerief zullen ervaren. Bij het EAM model zal maximaal 25% van de dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (circa 30 dieren) ernstig ongerief ondervinden. Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal. Tevens wordt er zo'n klein mogelijk volume ingespoten om de zwelling van de pootjes te beperken.*

*Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.*

10. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis.*

*Het verwachte resultaat, atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen bij patiënten met myocarditis, is afgewogen tegen het, overwegend matige en bij maximaal 30 ratten als ernstige ingeschatte ongerief, aantasting van integriteit en het doden van de dieren in de proef.*

*Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diersmodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model) , omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkregen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.*

*Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Zowel het wetenschappelijke als het maatschappelijke belang worden door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere behandelingsmethoden voor patiënten.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn wordt behaald. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en het daarbij verwachte overwegend matige en bij maximaal 30 ratten ernstige ongerief.*

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ✓ *De DEC adviseert de vergunning te verlenen*

### 2. *Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheid.*

*Eén lid van de DEC maakt een andere afweging, gezien het mogelijk ernstig ongerief voor maximaal dertig dieren. Het lid vraagt zich af of dergelijk ongerief wel kan worden gerechtvaardigd. Lijden is wellicht voor een belangrijke mate diersoort onafhankelijk. Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, gaat dit lid niet mee in het positieve advies van de commissie.*

*Hoewel in dit project gebruik van een zwaar ziektemodel onvermijdelijk is, waarbij een belangrijk deel van de dieren mogelijk ernstig ongerief zal ondervinden, acht de DEC dat met het beschreven project belangrijk inzicht gevonden zal worden in het proces van atriale ontsteking bij myocarditis. Bovendien wordt in 2 verschillende modelsystemen naar dit proces gekeken (te weten; viraal en auto-immuun), wat de belangen verder vergroot. Met het behalen van de projectdoelen kunnen duidelijke stappen voorwaarts gezet worden in de ontwikkeling van mogelijke diagnostiek van deze ziekte in de kliniek. De meerderheid van de DEC vindt deze grote wetenschappelijke en maatschappelijke belangen in voldoende mate opwegen tegen de geschade dierenbelangen.*



Aanvullend advies van DEC VU/VUmc op de vragen van de CCD over het DEC-advies betreffende aanvraag AVD114002016513.

1) Citaat uit uw advies: *"Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels."*

U geeft hier aan dat er nog vragen zijn bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels. Verderop in uw advies gaat u hier niet meer op in. Waren deze vragen opgehelderd op het moment dat u het advies heeft gefinaliseerd of staan deze vragen nog open? In geval dat deze vragen nog open staan, welke vragen zijn dit dan nog?

Antwoord punt 1: De formulering kon inderdaad wat nauwkeuriger. Na de eerste beantwoording van de vragen waren er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels, dat is in de laatste vraagronde hersteld. Daarbij zijn alle vragen opgehelderd voordat de DEC het DEC-advies had gefinaliseerd.

2) U geeft aan dat het uitgebrachte advies niet door alle DEC leden wordt gesteund. U schrijft hierbij: *"Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, ...."* Het is ons niet geheel duidelijk wat hiermee bedoeld wordt. Kunt u dit verhelderen?

Antwoord punt 2:

In de aanvraag komt naar voren dat: *"Bij het EAM model wordt in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat alle dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal krijgen (circa 30 dieren)."* Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervindt minimaal."

De meerderheid van de DEC commissie geeft een positief advies, hierbij heeft men het ernstige ongerief bij de dieren meegenomen in de afweging. Er is 1 DEC lid dat niet meegaat met dit advies, dit lid is van mening dat het ernstige ongerief bij de dieren niet opweegt tegen de belangen van het onderzoek. De IvD heeft de onderzoekers geadviseerd de dieren in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag te controleren, om zo het ernstige ongerief te beperken tot een minimum. Helaas is er geen mogelijkheid om ernstig ongerief geheel te voorkomen, ook niet door meerdere controles per dag (twee of meer) uit te voeren. Het DEC lid dat niet meegaat in het advies is van mening dat omdat het ernstige ongerief/lijden niet voorkomen kan worden (ook niet door de vastgestelde controle momenten) het belang van het onderzoek niet opweegt tegen het ongerief bij de dieren. De IvD zal er tijdens het opstellen van het werkprotocol en het uitvoeren van de experimenten streng op toe zien dat de humane eindpunten duidelijk worden vastgesteld en gehanteerd. Tevens zullen er extra controles plaatsvinden door de 13f functionaris in de gevallen waar kans is op ernstig ongerief.

De DEC VU/VUmc hoopt u op deze manier voldoende informatie te hebben gegeven, mocht er nog meer informatie/toelichting nodig zijn dan horen wij dat graag.