

Inventaris Wob-verzoek W16-21S									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016531</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies			x					
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mails vragen en antwoorden 26-5-2016				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	
10	Mail terugkoppeling DEC 16-6-2016				x		x	x	



02 MEI 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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	30244197
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> 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] <input checked="" type="checkbox"/> 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  | 31 - 5 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van anti-aritmische therapieën, pro-aritmische screening van medicatie en risicopredictie van hartritme stoornissen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

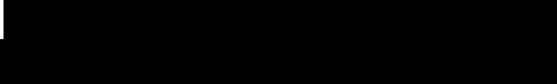
## 6 Ondertekening

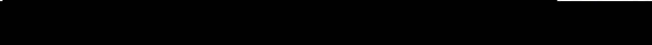
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). 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 Utrecht

Datum 20/04/2016

Handtekening 





## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11529
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. UMC Utrecht, Department of Medical Physiology
- 1.3 Provide the title of the project. Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

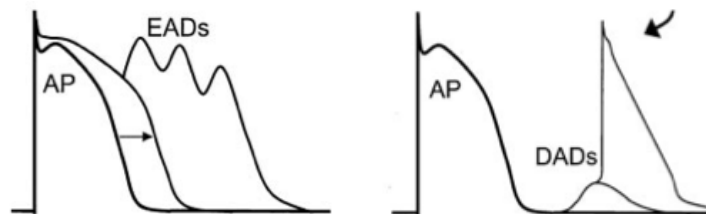
Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

## Background

### *Ventricular remodeling predisposes the heart to arrhythmia*

Despite advances in diagnostic possibilities and therapeutic interventions, cardiovascular diseases remain the most common cause of mortality and morbidity in developed countries. Sudden cardiac death due to ventricular arrhythmias accounts for approximately 50% of cardiovascular deaths (Huikuri et al., *New England Journal Medicine*, 2001). Incidence of acquired ventricular arrhythmias is relatively high in patients with ventricular remodeling due to ischemic or non-ischemic cardiomyopathy. Ventricular remodeling is a (mal)adaptive response of the heart to altered stress, such as a myocardial infarction, hypertension, valvular abnormalities or an altered activation pattern (e.g. left bundle branch block). This remodeling process consists of structural (e.g. hypertrophy), contractile (altered  $\text{Ca}^{2+}$  handling) and electrical adaptations (altered repolarization). These adaptations aim to maintain normal contractile function, but make the heart highly susceptible for ventricular arrhythmias. Two important mechanisms that predispose the heart to arrhythmias are prolongation of the action potential duration (APD) and an altered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. A hallmark of electrical remodeling is downregulation of repolarizing potassium currents, which increases APD. Longer action potentials favor the occurrence of early after-depolarizations (EAD) which could trigger a polymorphic ventricular arrhythmia, called Torsade de Pointes (TdP) arrhythmia. TdP could, if not self terminating, degenerate into ventricular fibrillation and lead to sudden cardiac death. In addition, alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, may cause a  $\text{Ca}^{2+}$  overload in the cardiac cell. When this excess  $\text{Ca}^{2+}$  is extruded out of the cell, an inward current is generated. When large enough, this inward current could result in delayed after-depolarizations (DAD) that could also act as a trigger for ventricular arrhythmias.



**Figure 1. Early after-depolarizations (EAD) and delayed after-depolarizations (DAD)**

Despite advantages in our understanding of ventricular remodelling and the electrophysiological mechanisms underlying arrhythmias, therapeutic options for the treatment of ventricular arrhythmias are limited. The majority of antiarrhythmic drugs available today have shown to increase mortality due to their proarrhythmic properties and are therefore contraindicated as preventive therapy in these patients.

In the first decade of the century, two large randomized controlled trials, the MADIT II and SCD-HeFT trial, have shown that patients with diminished cardiac function, expressed as a low left ventricular ejection fraction (LVEF), benefit from prophylactic implantation of an implantable cardioverter-defibrillator (ICD) (Moss et al., *New England Journal Medicine*, 2002; Bardy et al., *New England Journal Medicine*, 2005). Since the publication of these landmark trials, ICD implantation has become the mainstay of therapy for the prevention of sudden cardiac death. However, besides being exposed to side-effects such as infection, inappropriate shocks and re-operation due to battery depletion, up to two thirds of the patients with a prophylactic ICD implanted do not receive life-saving ICD shocks (Koller et al., *Circulation*, 2008). Furthermore, ICD therapy does not avoid occurrence of ventricular arrhythmias but only prevent sudden cardiac death. Moreover, a number of patients, who do not fulfil the criteria for prophylactic ICD implantation, still die from sudden cardiac death. Therefore, better risk stratification of sudden cardiac death is needed, to determine which patients benefit the most from ICD therapy.

### *Risk stratification*

Numerous non-invasive risk markers have been proposed and evaluated for the stratification of patients with high and low risk of ventricular arrhythmias. Most of these markers are ECG-derived parameters such as heart-rate variability or microvolt T-wave alternans. A recent study have showed that post-extrasystolic potentiation (PESP), which describes the augmentation of the beat following an extrasystolic

beat, could be used as a predictor of mortality in postinfarction patients (Sinnecker et al., Journal of American Heart Association, 2014). This study did not stratify mortality for arrhythmic death or non-arrhythmic death due to pump failure. Post-extrasystolic potentiation is the result of changes in calcium handling. Due to refractoriness of  $\text{Ca}^{2+}$  release channels during the short interval, less calcium is released at the premature beat. At the subsequent postextrasystolic beat, more calcium is available, which result in a forceful contraction. As stated above, altered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is an expression of ventricular remodelling in cardiac disease and may be a trigger for arrhythmias. PESP could be seen as a macroscopic measure of calcium handling and could thus function as a potential marker of arrhythmia. In the reported study by Sinnecker et al. PESP was measured non-invasively as a change in blood pressure. However, previous reports used contractility measures (LV  $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ ) for determination of PESP. It is not known how these non-invasive measurements are correlated to the invasive parameters of PESP. However, if this non-invasive PESP is a valid reflection of cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  handling, then this might be very useful tool in risk stratification of sudden cardiac death.

#### *Anti-arrhythmic strategies*

While ICD therapy may prevent sudden cardiac death, it does not prevent ventricular arrhythmias. Therefore, development of new antiarrhythmic strategies remain necessary to improve life quality of high risk patients. Current antiarrhythmic drugs include calcium and sodium channel blockers. However, related to their pharmacology, known adverse effects significantly affect cardiac function and electrical conduction, two components already compromised in heart failure conditions. As a consequence, their use is strongly limited among this patient population. Furthermore, the better understanding of the cellular and molecular basis of cardiac arrhythmias has given rise to new potential pharmacological targets. As an example, we recently showed in our department that the specific inhibition of the late sodium current performed as good as calcium blockers in suppressing TdP arrhythmias in vivo (■■■■ ■■■■ ■■■■) without slowing conductivity or affecting cardiac function. This further supports the necessity to investigate novel and safe antiarrhythmic strategies through the evaluation of new antiarrhythmic drugs. Possible candidate drugs consist of these late sodium current blockers or autonomous nervous system modulators.

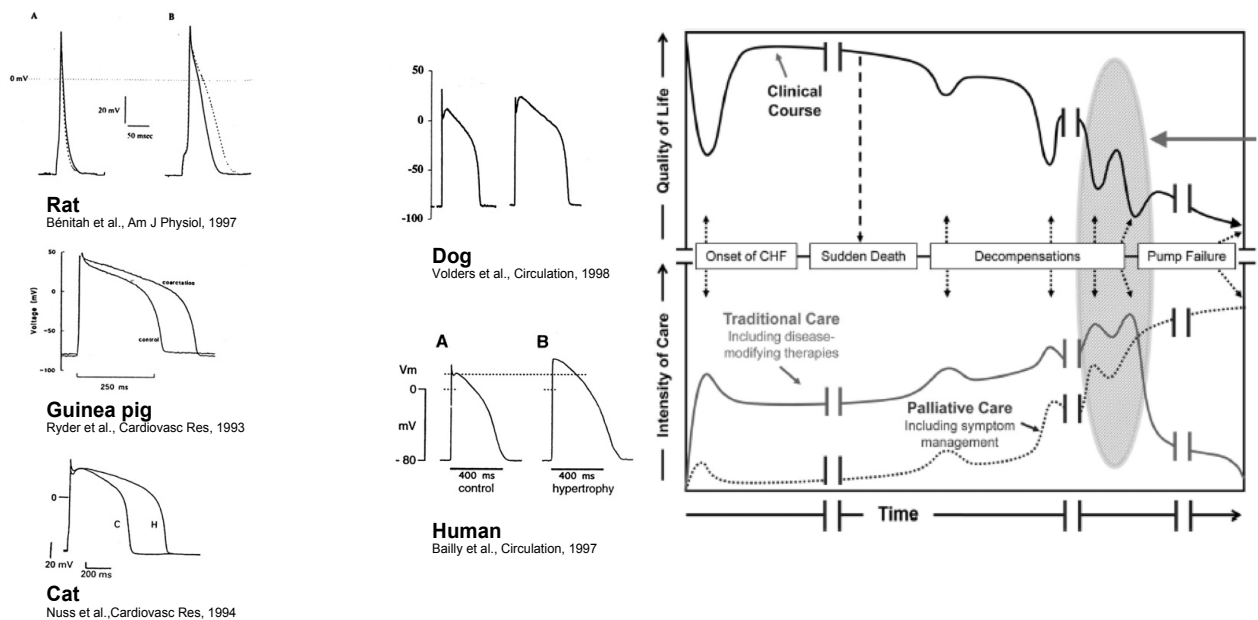
#### *Pacing-induced ventricular remodeling*

Finally, certain device-based interventions might even be deleterious for cardiac function. A frequently-used therapeutic intervention, right ventricular pacing, may cause unwanted ventricular remodelling. Cardiac pacing is the most often used treatment modality for bradycardia syndromes (e.g. complete AV-block, sick sinus syndrome) and the right ventricular apex (RVA) is the usual location for lead placement. However, in the last decades a substantial number of reports have been published concerning the possible detrimental effects of RVA pacing. The abnormal activation pattern (e.g. the interventricular septum is activated early compared to the lateral free wall) may cause deterioration of left ventricular ejection fraction or may even form a substrate for arrhythmia. However, the electrophysiological effects of RVA pacing on tissue and cellular level are still unknown.

#### *The chronic atrioventricular block dog model*

To investigate ventricular remodeling and associated ventricular arrhythmias in an animal model, one must be aware of differences in physiology of electrical signal propagation between species. As illustrated in figure 2 (left), the morphology of the action potential differs significantly between species due to a different expression profile of cardiac ion channels, mainly sodium, calcium or potassium channels. In order to extrapolate results of studies on arrhythmias to the patient, basic electrophysiological characteristics must be similar between the animal model and human. As one can appreciate from figure 2, the morphology of the action potential of the canine heart is most comparable to human, therefore this animal is frequently used for electrophysiological studies.





**Figure 2.** Morphology of cardiac action potential in different species (left) and clinical course of heart failure in patients (right)

Within our department, a dog model has been developed and extensively characterized to study ventricular arrhythmias: the chronic atrioventricular (AV) block (CAVB) dog model. In this animal model, the AV node is ablated which causes a significant bradycardia. Subsequently, the escape ventricular activation originates from a focus located within the ventricles, giving rise to the idioventricular rhythm (IVR). This chronic bradycardia will result in a volume overload to both ventricles, which causes mechanical, contractile and electrical remodelling, similar to the remodelling seen in patients with structural heart disease. Similar to patients, this initial event will result in a compensated state of hypertrophy, i.e. the animals will not show signs of decompensated heart failure. As illustrated in figure 2 (right), sudden cardiac death is especially prevalent in this compensated phase. Thus, the CAVB dog model, in contrast to a heart failure model, represents the vulnerable patient who is at risk of arrhythmias.

After remodelling, these animals are highly susceptible for ventricular arrhythmias, such as TdP, when induced by an additional challenge with dofetilide, a gold standard drug blocking an important current ( $I_{Kr}$ ) involved in the repolarization process. Because of this additional 'hit' needed to induce arrhythmias, the occurrence of arrhythmia can be controlled. Furthermore, dofetilide-induced TdP incidence is highly reproducible in this model (~95%). This model has therefore high value in the assessment of new screening modalities for arrhythmia or to test the efficacy of new anti-arrhythmic agents. Because of the reproducibility of arrhythmias, a serial comparison is possible between a known proarrhythmic drug (dofetilide) with a drug evaluated for its anti-arrhythmic properties.

However, in the regular CAVB dog, there is no control over the origin of the IVR after induction of AV block. Therefore, ventricular activation is altered but the origin of its focus may be unstable during follow up period. This inconsistent activation pattern complicates research into mechanisms underlying the role of activation pattern in ventricular remodelling and arrhythmogenesis. To maintain a stable but altered ventricular activation pattern compared to sinus rhythm, our group decided to implement right ventricular apical (RVA) pacing in the CAVB dog model. This induces mechanical dyssynchrony, during which the ventricles no longer contract simultaneously. Recent work showed that the immediately induced mechanical dyssynchrony by bradycardic RVA pacing was partially reversed after 3 weeks remodeling. The partial restoration of mechanical synchrony occurred without apparent baseline electrical effects. However, dofetilide clearly unmasked (region specific) arrhythmic consequences of remodeling (Dunnink et al, 2009). Other studies evaluating electrophysiological adaption associated with an altered

activation pattern also showed regional differences but the relation between early and late activated regions was not consistent. (Aiba et al., *Circulation*, 2009; Jeyaraj et al., *American Journal of Physiology*, 2013; Jeyaraj et al. *Circulation*. 2007). Adaption of the heart during RVA pacing needs to be further evaluated as well as its influence on the susceptibility to TdP and the underlying cellular mechanisms.

As a summary, this research proposal will address the following:

- 1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)**
- 2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies**
- 3. Ventricular remodeling related to altered activation**

### **3.2 Purpose**

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

#### **1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)**

Is PESP changed in the chronic AV-block dog model?

Is there a correlation between high PESP and arrhythmic events?

Is PESP measured non-invasively correlated to invasive contractility measures (LV dp/dtmax)?

#### **2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies**

What is the antiarrhythmic efficacy of the investigated strategy?

Is the drug able to suppress or prevent occurrence of TdP arrhythmias in vivo and early afterdepolarizations in vitro?

Does this observed antiarrhythmic effect is associated with electrophysiological changes?

Comparison of antiarrhythmic effect and electrophysiological changes with known reference drugs. What are the clinical implications and potential applications of this new antiarrhythmic strategy?

#### **3. Ventricular remodeling related to altered activation**

What is the effect of RVA bradycardia pacing on cardiac electro-mechanical remodelling?

What is the mechanism underlying, and time span of, reversal of mechanical dyssynchrony (mechanical adaption) after chronic RVA pacing?

Does RVA bradycardia pacing induce regional cellular electrophysiological differences?

Is there a correlation between the phase of adaption and the risk of repolarization dependent arrhythmias?

### **Achievability**

#### **Objectives 1. and 2.**

Based on the enhanced and reproducible susceptibility to dofetilide-induced TdP arrhythmias in the CAVB dog model, as well as our expertise in hemodynamic and electrophysiological recording in vivo and in vitro studies, these research questions are achievable.

#### **Objectives 3.**

The same accounts for this objective. However, up till now no cellular experiments have been performed elucidating the exact regional remodeling due to altered (but stable), dyssynchronous activation and bradycardia. This research question requires electrophysiological cellular experiments in which our lab is experienced, e.g. patch clamping and fluorescence microscopy imaging performed with isolated cardiomyocytes. Besides experiments with isolated cardiomyocytes, experiments with multicellular preparations, i.e. cardiac slices, will also be performed. By using multiple techniques to investigate electrophysiological remodeling in the same animal we aim to compare results of isolated cardiomyocytes to those of multicellular preparations but it will also ensure results.

### 3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Despite progress in diagnosis and treatment of cardiovascular diseases, it still remains one of the most frequent cause of death in developed countries, including sudden cardiac death related to ventricular arrhythmias.

ICD implantation represents the most frequently used approach to prevent sudden cardiac death in high risk patients. Based on contractile function, more than 100.000 ICD are implanted each year, and cost overall more than 2 billion euros worldwide. As discussed before, only one third of these patients receive life-saving ICD shocks, but patients are still exposed to side effects; inappropriate shocks have a high impact on patients lives and can cause severe psychological distress and anxiety. Thus, a better risk prediction for ventricular arrhythmias via specific and sensitive markers of arrhythmic susceptibility would have a significant (clinical, socioeconomical, psychosocial) benefits. As a consequence, new parameters for risk stratification are highly needed. The new data on PESP shows that this marker might be a useful predictor, which is non-invasive and easy to apply. However, due to its novelty little is known about the relation between PESP and arrhythmias. Therefore, experimental studies on this new parameter are urgently needed.

Furthermore, antiarrhythmic drugs currently used to prevent ventricular arrhythmias, mostly calcium and sodium blockers, are associated with adverse effect that significantly affect cardiac function already compromised in heart failure conditions and can even be proarrhythmogenic. As a result, their clinical use is strongly restricted among these patients. Therefore, the development of more efficient antiarrhythmic strategies – while being safer – is needed for a better prevention of fatal arrhythmias.

Finally, a large subgroup of patients suffering from cardiovascular disease (e.g. dyssynchronous heart failure) have an altered activation pattern of the ventricles. Moreover, RVA pacing is a widely used therapeutic option for patients with an AV conduction disorders, sick sinus syndrome, brady-tachy syndrome and long QT syndrome. Therefore more insight in the effect of altered ventricular activation, either due to RVA pacing or due to cardiovascular disease itself, on cardiac remodelling and arrhythmogenesis might improve treatment strategies for patients with cardiovascular disease.

### 3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

The CAVB dog model has been used extensively by our research group for the last decades to assess anti- and pro-arrhythmic properties of new drugs as well as the identification of new markers of refelecting the proarrhythmic risk. Therefore, this model will be used to develop predictive markers of proarrhythmic risk, to investigate efficacy of novel antiarrhythmic strategies and to study ventricular remodeling processes related to altered activation.

#### 1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)

Hemodynamic and electrophysiological markers will be developed to further identify arrhythmic susceptibility of individuals.

To investigate new marker of proarrhythmic susceptibility, the parameter can be measured in control sinus rhythm (SR) conditions and compared to unremodelled (acute AVB) and remodelled circumstances (chronic AVB) to evaluate if this marker changes due to cardiac remodelling. In addition, incidence and severity of arrhythmias will be correlated with this parameter. Moreover, susceptible and non-susceptible CAVB dogs can be compared, to unravel a relation between this parameter and proarrhythmic susceptibility.

PESP is a hemodynamic marker that will be measured non-invasively and validated to its invasive equivalent.

#### 2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies

Novel antiarrhythmic strategies will be chosen according to their innovative pharmacology targeting cardiac ion channel, pump or transporter or any other physiological system (i.e. the autonomic nervous

system) implicated directly or indirectly in the occurrence of ventricular arrhythmias. To evaluate this new antiarrhythmic strategy, electrophysiological effects of the drug (ECG intervals and electrophysiological parameters) have to be first determined under control conditions (sinus rhythm dogs). This first step may require up to 2 experiments with a maximum of 2 doses per experiment (calculated to reach relevant plasma exposure) to determine a dose-response relationship.

Then, the antiarrhythmic efficacy of the drug can be evaluated in CAVB dogs possibly in two different ways, after (suppression) or before (prevention) a proarrhythmic (dofetilide) challenge. In the first case, dofetilide will induce TdP arrhythmias and the suppressive antiarrhythmic effect of the strategy will be evaluated. In the second case, incidence of arrhythmias will be monitored after dofetilide in presence of the investigated antiarrhythmic drug.

Incidence and severity of arrhythmias will be compared between the two periods. Similarly, a drug dose-antiarrhythmic response may be necessary, resulting in several dofetilide testings. If no TdP arrhythmias are observed after dofetilide administration, the antiarrhythmic strategy will not be evaluated.

At the cellular level, experiments will be performed in cardiomyocytes isolated from SR and CAVB dogs. The antiarrhythmic efficacy of the drug will be assessed after dofetilide-induced EADs.

For this objective, based on our throughput capacity (from previous years), about 4 novel antiarrhythmic drugs can be studied every year via in vivo and in vitro investigations. For this objective, **only** animals exhibiting Torsade de Pointes arrhythmias after dofetilide challenge (in 70-75% of animals) will be used. The reason is that the efficacy of an antiarrhythmic strategy can only be assessed if arrhythmias occur after dofetilide.

For these reasons, animals resistant to dofetilide challenge will be discarded from this research objective.

However, objective 1. (part New markers of arrhythmic susceptibility) focusing on the prediction of ventricular arrhythmias occurrence will therefore require both resistant and inducible animals.

### **3. Ventricular remodeling related to altered activation**

For this research objective, SR and CAVB dogs will be necessary.

Previous research focused on remodelling in the CAVB dog model and its effects on arrhythmogenesis. To investigate the effect of stable but altered ventricular activation on ventricular remodelling and arrhythmogenesis, we will use the CAVB dog model paced from the right ventricle apex (RVA). In order to evaluate the processes of cardiac adaption and ventricular remodelling correlated with the susceptibility to TdP, serial in vivo experiments will be performed and followed after sacrifice by cellular (in vitro) investigations.

Previous work showed bradycardic RVA pacing induced mechanical dyssynchrony immediately which was partially reversed after 3 weeks remodeling. The latter occurred without apparent baseline electrical effects. However, dofetilide clearly unmasked (region specific) arrhythmic consequences of remodelling (Dunnink et al., *Europace*, 2012). We now aim to evaluate whether a longer period of remodelling allows the heart to truly restore dyssynchrony and evaluate the cellular effects.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

#### **Outline of the different components of the project**

##### **1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)**

At the start of the experiment, baseline measurements in sinus rhythm are recorded and AV node is ablated. After AV-node ablation a PESP pacing protocol is performed. Because PESP is highly influenced by the extrasystolic and postextrasystolic intervals, the heart is paced and the extrasystole and postextrasystolic beat are introduced at specific intervals. This pacing protocol is repeated at different basic rhythms. During this protocol mechanical and electrophysiological parameters are measured. This pacing protocol is repeated after dofetilide infusion. After chronic AV-block the same pacing protocol is performed and measurements are recorded to compare with baseline conditions. Finally, dofetilide testing is performed to evaluate susceptible to TdP arrhythmias.

##### **2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies**

Electrophysiological effects of the antiarrhythmic strategy will be evaluated under unremodelled

conditions. The antiarrhythmic efficacy of the strategy will be assessed after dofetilide-induced TdP arrhythmias in CAVB.

Antiarrhythmic properties against dofetilide-induced EAD will be confirmed in vitro in cardiomyocytes isolated from unremodelled and remodelled dogs.

### 3. Ventricular remodeling related to altered activation

Dofetilide tests will be performed serially within the same dog to compare different stages of cardiac remodelling (SR, acute AVB and several chronic AVB time points) and associated with arrhythmogenesis. Moreover, echocardiograms and cardiac magnetic resonance imaging (MRI) will be performed at the same time points before dofetilide tests to correlate cardiac function at the phase of cardiac remodelling.

Table 1. summarizes the basic outline of each research objective:

Research objective	Sinus rhythm dogs		Acute AV block dogs	Chronic AV block dogs	Cellular experiments
1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)	PESP/hemodynamic parameters and electrophysiology	AV node ablation	PESP/hemodynamic parameters, arrhythmias and electrophysiology	PESP/hemodynamic parameters, arrhythmias and electrophysiology	
2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies	Effect of the drug under physiological conditions (electrophysiology)			Antiarrhythmic efficacy against dofetilide-induced TdP (electrophysiology, arrhythmias)	Antiarrhythmic efficacy against dofetilide-induced EADs in cardiomyocytes isolated from SR and CAVB dogs (electrophysiology, arrhythmias)
3. Ventricular remodeling related to altered activation	Echocardiography and cardiac imaging		Acute RVA pacing: - Echocardiography and cardiac imaging - Arrhythmias and electrophysiology	Serial experiments after chronic RVA pacing -> different stages of remodeling - Echocardiography and cardiac imaging - Arrhythmias and electrophysiology	- Electrophysiological comparison between early and late activated region - Regional ventricular remodeling

Table 1. Outline of the different research objectives

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

As stated in the Background section, the most important challenges in the prevention of sudden cardiac death in patients with remodelled hearts are improvement of risk stratification and the development of new preventive antiarrhythmic drugs. In addition, in the last years it has become clearer that asynchronous pacing may be detrimental and result in remodelling. However, ventricular remodelling is a complex process, which includes mechanical, functional and electrical changes at the both tissue and cellular levels. Therefore, to investigate these questions, we need a model that resembles this process in all of these different aspects. The CAVB dog model is an ideal tool to investigate and answer these important questions: proarrhythmic risk prediction and stratification, development of new antiarrhythmic strategies, and the electrical changes caused by RVA pacing. Objectives could be combined during the same procedure to further reduce the number of animals and discomfort associated to multiple procedures (see Figure 5. in the enclosed Appendix form).

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	





## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.  
*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*
- | Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 1             | Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling |

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

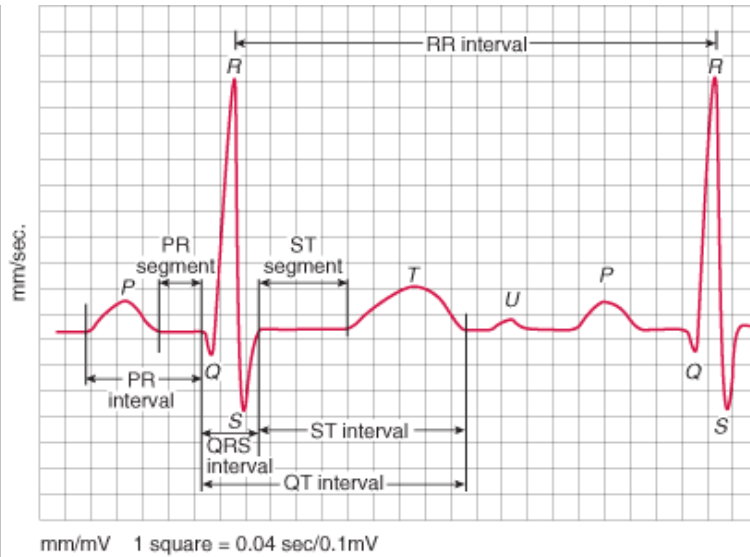
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

In each research objective detailed below, the cardiac electrophysiology will be studied in relation with ventricular arrhythmias in control, unremodeled and remodelled conditions. Electrophysiological recordings will include ECG intervals (Figure 1.)

- RR interval: effect on heart rate
- PR and/or QRS intervals: effect on electrical conduction
- QT and QTc (QT corrected for heart rate) intervals: effect on repolarization

associated with the regional electrophysiological activity recorded from electrode catheters placed in the left and right ventricles (LV and RV) and inserted via femoral artery and vein.

These parameters will be referred below as "electrophysiological parameters".



**Figure 1.** Electrocardiogram and its associated intervals

**1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)**

This experiment aims to assess, at different stages of cardiac remodeling, the correlation of post-extrasystolic potentiation (PESP) with pro-arrhythmic outcome in order to evaluate PESP value as a predictor of ventricular arrhythmias. In addition, the correlation of PESP of LV dP/dt max to PESP of non-invasively measured blood pressure will be assessed, to see if non-invasive measurements can be used to measure PESP and thus may serve as a non-invasive marker of arrhythmia susceptibility. Post-extrasystolic potentiation will be measured invasively using a LV pressure catheter and non-invasively using a photoplethysmographic device (Finapres©) along with electrophysiological parameters before and after dofetilide-induced TdP.

Sinus rhythm + acute AV block		Chronic AV block	
Experiment #1	Experiment #2	Experiment #3	Experiment #4
Proarrhythmic marker under control and acute AV block (unremodelled) conditions Dofetilide challenge	Proarrhythmic marker under chronic AV block (remodelled) conditions at early stage Dofetilide challenge	Proarrhythmic marker under chronic AV block (remodelled) conditions later stage Dofetilide challenge	Proarrhythmic marker under chronic AV block (remodelled) conditions end stage Dofetilide challenge
Correlation between PESP and arrhythmic susceptibility or resistance	Correlation between PESP and arrhythmic susceptibility or resistance	Correlation between PESP and arrhythmic susceptibility or resistance	Correlation between PESP and arrhythmic susceptibility or resistance

**Figure 2.** Flowchart of experiments for development of markers of proarrhythmic susceptibility

**2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies**

**Sinus rhythm experiments**

The first experiment consists in the administration of the investigated drug in normally-conducted SR dogs. Its effect on electrophysiological parameters under control conditions will be determined. Up to two SR experiments may be required (maximum 2 doses per experiment) to determine the drug's dose-response relationship.

At the end of the last SR experiment, the atrioventricular (AV) node will be ablated by radiofrequency to create complete AV block.

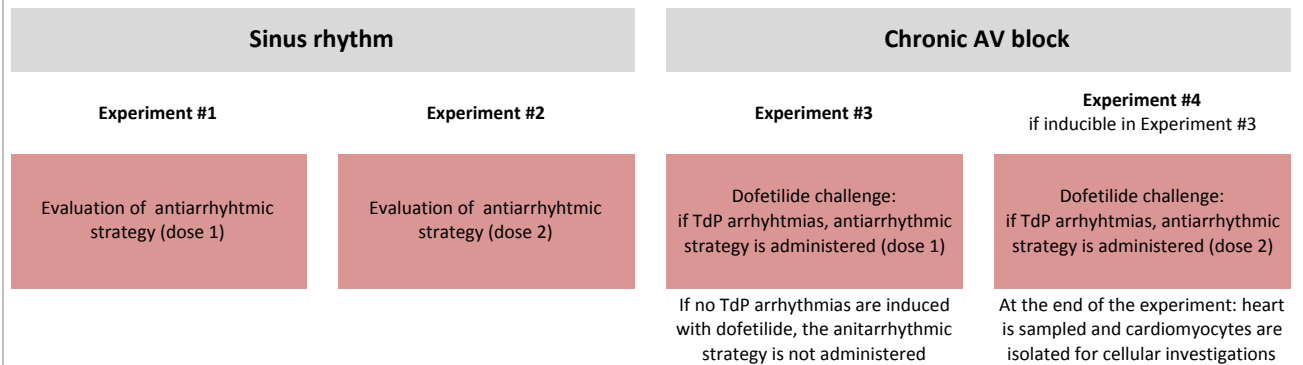
**Chronic AV block experiments**

The antiarrhythmic efficacy of the strategy will be investigated in CAVB dogs after dofetilide-induced TdP.



Electrophysiological parameters associated with incidence/severity of TdP arrhythmias will be compared between dofetilide and antiarrhythmic strategy periods within the same experiment.

At the end of the last (terminal) CAVB experiment, the heart will be sampled and cardiomyocytes will then be isolated to perform additional cellular experiments meant to confirm previous in vivo outcomes.

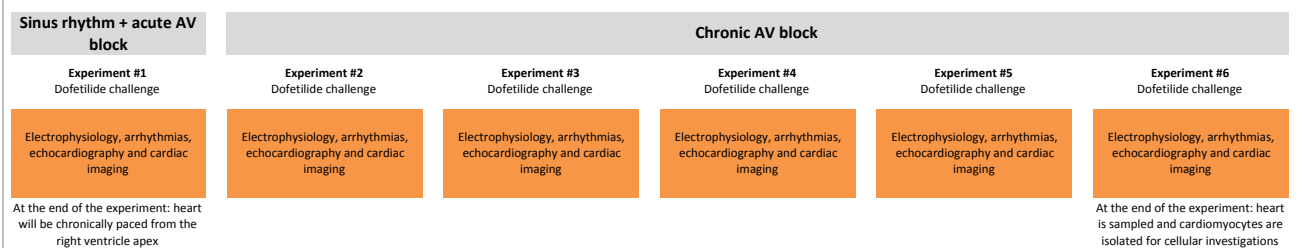


**Figure 3.** Flowchart of experiments for evaluation of novel antiarrhythmic strategies

### 3. Ventricular remodeling related to altered activation

The aim of this project is to assess the process of cardiac ventricular remodelling due to altered ventricular activation and evaluate its effect on TdP arrhythmia susceptibility in the CAVB dog model. Therefore the general design of the animal procedures involves serial in vivo experiments assessing cardiac remodelling and arrhythmia susceptibility. Cardiac remodelling will be evaluated both based on electrophysiological parameters, echocardiogram and cardiac imaging techniques. To assess correlation between cardiac remodelling and arrhythmia susceptibility dofetilide testing will also be performed on the same occasions.

To investigate the underlying electrophysiological mechanism of the cardiac remodeling related to altered activation, cellular experiments will be performed after termination of the dogs.



**Figure 4.** Flowchart of experiments addressing ventricular remodeling related to altered activation

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

All described experiments will be performed under general anesthesia (intravenously induced and maintained by inhalation) after animals were sedated.

#### 1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)

Anesthetized experiment: about 3 hours duration, at least 2 weeks interval between 2 consecutive experiments, maximum of 6 anesthetized experiments

Procedure: Invasive LV pressure measurement, non-invasive Finapres© pressure measurement, ECG recording and catheterization of femoral artery and vein to access LV and RV for electrophysiological measurements.

#### Sinus rhythm and acute AV block conditions (1 experiment)

Electrophysiology and pressure (invasive LV pressure and non-invasive with Finapres©) will be measured:

1. Baseline measurements in control SR conditions (electrophysiological parameters, LV dP/dt max, Finapres©)
2. AV node ablation
3. Baseline measurements in unremodelled (acute AV block) conditions (electrophysiological parameters, LV dP/dt max, Finapres©, arrhythmias), followed by:
4. Dofetilide administration in acute AV block conditions (electrophysiological parameters, LV dP/dt max, Finapres©, arrhythmias)

A pacing protocol will be performed at baseline and dofetilide acute AV block conditions to induce extrasystolic beat at specific intervals. The dP/dtmax and change in blood pressure by the Finapres© of the post-extrasystolic beat are measured.

### **Chronic AV block conditions**

After a remodeling period, similar procedures as under acute AV block conditions will be conducted:

1. Baseline measurements in chronic AV block conditions (electrophysiological parameters, LV dP/dt max, Finapres©, arrhythmias), followed by:
2. Dofetilide administration in chronic AV block conditions (electrophysiological parameters, LV dP/dt max, Finapres©, arrhythmias)

A pacing protocol will be performed at baseline and dofetilide (like under acute AV block conditions) to induce extrasystolic beat at specific intervals. The dP/dtmax and change in blood pressure by the Finapres© of the post-extrasystolic beat are measured.

Up to 3 experiments under chronic AV block conditions will be performed to serially evaluate PESP at several stages (early until end stage) of cardiac remodeling in the CAVB dog model.

## **2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies**

Anesthetized experiment: about 3 hours duration, at least 2 weeks interval between 2 consecutive experiments, maximum of 6 anesthetized experiments

Procedure: ECG recording and catheterization of femoral artery and vein to access LV and RV for electrophysiological measurements.

### **Sinus rhythm conditions**

Electrophysiological parameters will be measured before (baseline) and after administration of the investigated drug. Up to 2 SR experiments (maximum of 2 doses per experiment) may be necessary to complete the dose-response profile of the antiarrhythmic drug investigated.

At the end of the last SR experiment, AV node will be ablated.

### **Chronic AV block conditions**

After a remodeling period, the antiarrhythmic efficacy of the strategy will be evaluated after dofetilide-induced TdP arrhythmias. Incidence/severity of arrhythmias along with electrophysiological parameters will be compared between dofetilide and antiarrhythmic drug period. Up to 2 CAVB experiments, during which the antiarrhythmic drug (different doses) will be administered, may be necessary to complete its dose-response profile.

## **3. Ventricular remodeling related to altered activation**

Anesthetized experiment: about 4 hours duration, at least 2 weeks interval between 2 consecutive experiments, maximum of 6 anesthetized experiments

Procedure: Echocardiography, cardiac imaging technique, ECG recording and catheterization of femoral artery and vein to access LV and RV for electrophysiological measurements.

### **Sinus rhythm and acute AV block conditions (1 experiment)**

1. Baseline measurement in SR conditions (electrophysiological parameters, echocardiography, cardiac imaging techniques)

2. Implantation of the pacemaker, positioning of right ventricular (RV) lead, positioning of epicardial right atrial (RA) lead after thoracotomy, closing of the thorax
3. AV node ablation
4. Baseline measurement in acute AV block conditions (electrophysiological parameters, echocardiography, cardiac imaging techniques) and paced from RV, followed by:
5. Dofetilide administration in acute AV block conditions (electrophysiological parameters, echocardiography, cardiac imaging techniques, arrhythmias) and paced from RV.
6. Animals will be chronically paced from RV.

### Chronic AV block conditions

Five serial experiments under chronic AV block conditions will serially be performed. At least 2 weeks interval will expire between each of them to allow recovery of animals.

During these experiments, similar procedures will be performed:

1. Baseline measurement in chronic AV block conditions (electrophysiological parameters, echocardiography, cardiac imaging techniques) and paced from RV, followed by:
2. Dofetilide administration in chronic AV block conditions (electrophysiological parameters, arrhythmias) and paced from RV

At the end of the last chronic AV block experiment, heart will be excised and sampled for cellular experiments investigating the remodeling differences within different regions of the heart.

For all research objectives, ECG recordings under awake conditions will be performed the day after the anesthetized experiment to ensure the recovery of animals.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

For each study, a sample size will be calculated based on the dofetilide inducibility in the CAVB dog model (70-75%) and on the threshold of relevance of the research question endpoint. Using the G-power 3.1 statistical software, an a priori analysis will compute required sample size.

Below is illustrated an example showing the calculation of a sample size for one particular study: example of an antiarrhythmic strategy.

To demonstrate the antiarrhythmic effect of a drug/intervention in the CAVB dog model, this strategy will be administered only after TdP arrhythmias were induced by dofetilide (inducibility ~75%). To consider the strategy as efficient antiarrhythmic, less than 25% of inducible dogs (with dofetilide) should still exhibit TdP arrhythmias after drug administration.

Determination of the odds ratio is the first step of sample size calculation and is performed as followed:

$$\text{Odds ratio} = (A/B)/(C/D)$$

	Presence of TdP	Absence of TdP
After dofetilide	A	C
After antiarrhythmic drug	B	D

A: inducible CAVB dogs with dofetilide: 75%

B: inducible CAVB dogs negatively responding to the antiarrhythmic drug/intervention (still presence of TdP arrhythmias): 25%

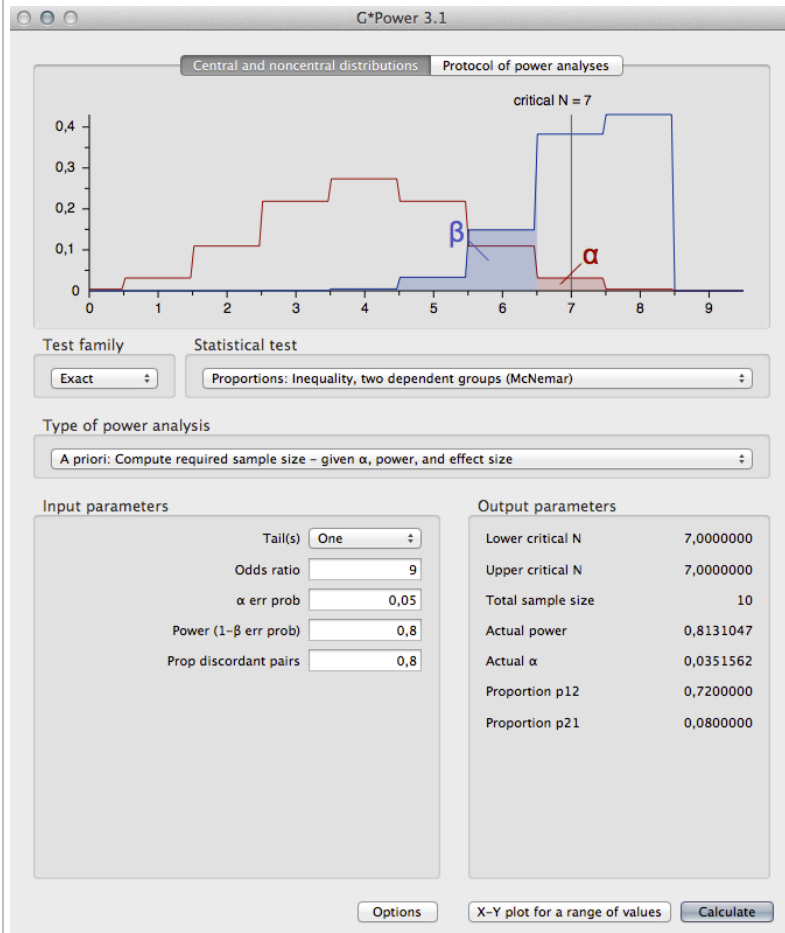
C: non-inducible CAVB dogs with dofetilide: 25%

D: inducible CAVB dogs positively responding to the antiarrhythmic drug/intervention (absence of TdP arrhythmias): 75%

$$\text{Odds ratio} = (0.75/0.25)/(0.25/0.75) = 9$$

In G-Power 3.1 statistical software, an a priori analysis is performed: "proportions: inequality, two

dependent groups, McNemar". (Figure 5.)



**Figure 5.** Screenshot of the G-Power 3.1 statistical software used for sample size calculation

Because incidence of TdP arrhythmias is expected to be lower after the evaluated antiarrhythmic drug/intervention than after dofetilide, a one-tail test is chosen.

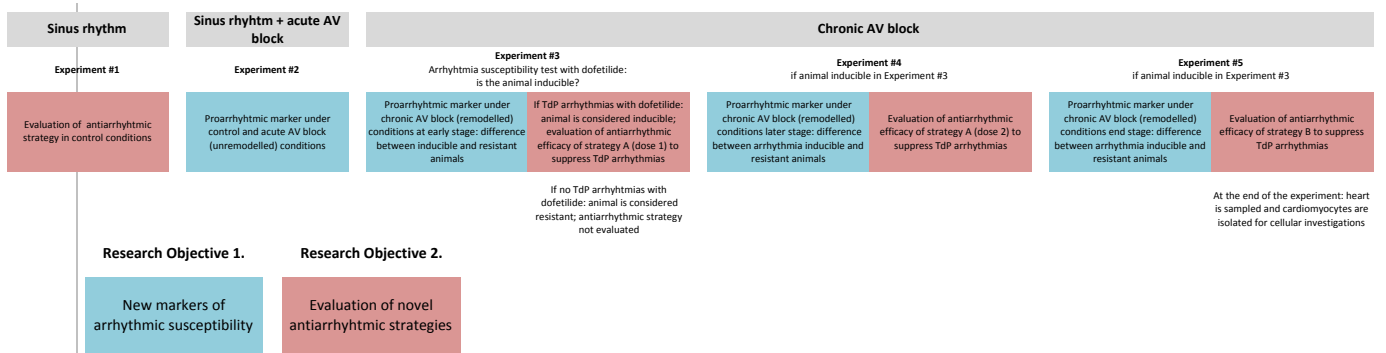
Computing Odds ratio (9), risk alpha (5%), power (80%) and proportion of discordant pairs (80%) in this software gives a sample size of 10 animals.

As a result, to determine if a drug/intervention provides an antiarrhythmic efficacy in the CAVB dog model, 10 animals are necessary.

Moreover, several other considerations have been taken into account. First, the re-use of animals will allow the reduction of the total amount necessary.

Moreover, research objectives 1. and 2. can be addressed within the same experiment and in the same animal. As an example, within a protocol evaluating a drug's anti-arrhythmic effect, a dofetilide experiment (susceptibility test) has to be performed in the first CAVB experiment. In this experiment, new markers of arrhythmic susceptibility can be measured at the same time. As a result, 2 research objectives can be addressed in 1 animal.

An example illustrating the combination of research objectives in the same animal and within the same experiment is represented in Figure 6.



**Figure 6.** Flowchart of experiments addressing research objectives 1. and 2. (corresponding colors) to reduce animals and experiments.

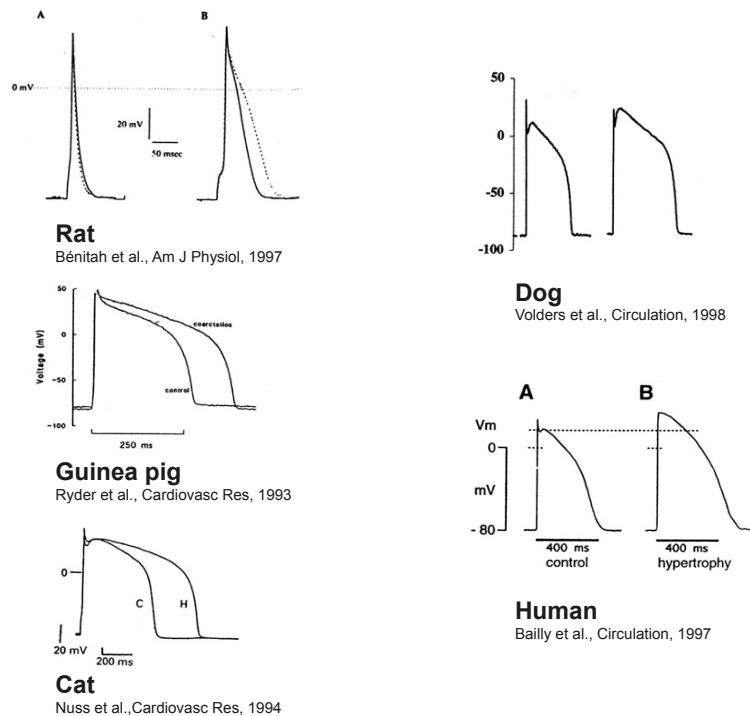
Objective 3 (ventricular remodeling related to altered activation) cannot be combined to the other objectives. This objective will unravel the structural, mechanical and electrical remodeling processes occurring in chronically paced subjects. Vice-versa, since this remodeling process and its associated arrhythmia susceptibility remain to be characterized, novel antiarrhythmic interventions and markers for arrhythmic susceptibility will not be evaluated.

Altogether, the combination of re-use of animals and the investigation of research objectives within one single experiment greatly reduces the total amount of animals necessary.

## B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

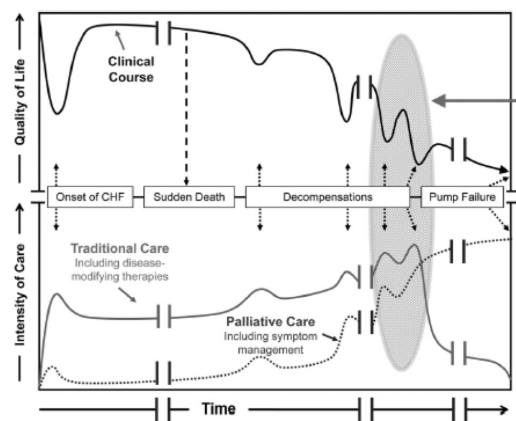
All our research objectives will investigate ventricular arrhythmias, in the form of Torsade de Pointes arrhythmias, within different aspects; development of new markers of arrhythmic susceptibility, novel antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling. Cardiac arrhythmias, by definition, are the results of an altered electrical activity of the heart, which results in an inappropriate contractile function. This electrical activity is the consequence of the propagation of action potentials throughout the entire heart. As illustrated on Figure 7., action potential morphology varies significantly among animal species resulting from a different expression profile of cardiac ion (sodium, calcium and potassium) channels.



**Figure 7.** Cardiac action potentials in several animal species.

For each animal species, action potentials are depicted from control and hypertrophied conditions.

Therefore, to answer our research objectives, we require an animal species with electrophysiological characteristics similar as humans. Because those of the canine heart are the most comparable to human anatomy compared with other species such as rabbit, rats, mice, cats or pigs.



**Figure 8.** Clinical course of heart failure in patients

Moreover, the CAVB dog model (with or without RVA pacing) will be chosen, a model by which our department has extensive experience and collected over the years a large dataset to compare new experiments with. The incidence of TdP in the presence of ventricular remodelling and dofetilide is reproducible.

In addition, the CAVB dog model is a model of compensated hypertrophy, not of decompensated heart failure. As seen in figure 8, SCD in patients occurs predominantly in the compensated phase after an event (e.g. myocardial infarction). The CAVB dog model, in contrast to a heart failure model, represents the vulnerable patient who is at risk of arrhythmias. Therefore the CAVB model is the ideal model for assessment of new proarrhythmic markers.

Furthermore, the CAVB dog model allows serial testing decreasing the number of animals necessary for this research project.

Finally, the size of the dog heart allows the use of catheters and pacemaker leads, which are developed for human purposes and are easily available.

Animal experiments will be performed in adult mongrel dogs purchased from Marshall, USA. At the end of the terminal experiment, remodeled cardiomyocytes will be isolated from CAVB dogs for cellular investigations including functional and electrophysiological experiments: measurement of cardiac ion currents and action potentials in isolated cells as well as spontaneous electrical activity in multicellular preparations. These experiments can **only** be performed within the same day of cellular isolation for two main reasons. The first one is that over time, when put in culture for example, these adult cardiomyocytes do not exhibit the same electrophysiological and functional properties as when freshly isolated: the amplitude of the cardiac ion currents measured decreases in time and the kinetic characteristics (opening and closing) of the ion channels are altered. As a result, the morphology of the cardiac action potential is changed and no longer physiologically relevant. Because we intend to correlate findings between animal and cellular experiments, we therefore need freshly isolated adult cardiomyocytes displaying physiological features.

As a result, these cells cannot be cultured and maintained over time for multiple cellular experiments and only freshly isolated cells are needed for this purpose.

In addition, surplus adult Beagle dogs from another facility will be used. These animals have already undergone experiments and would otherwise have been terminated. These dogs have been used mainly for studies on medications, which will have been fully excreted by the time of arrival. Furthermore, no experiments that will influence the electrical remodeling of the heart have been performed on these dogs. These dogs will be anesthetized and euthanized and they are used solely for the isolation of unremodeled cardiomyocytes for cellular and molecular analyses (no other measurements or interventions are performed). These cells will serve as control for the remodeled cardiomyocytes isolated from CAVB dogs. Control cardiomyocytes are needed for comparison of electrophysiological properties with remodelled cardiomyocytes. To reduce the number of animals, these surplus dogs are reused. For the same reasons mentioned above, isolated cells from these animals can only be used within the day of cellular isolation for electrophysiological investigations.

Based on our throughput capacity and on the average amount of animals used over the past years (around 20 adult mongrel dogs from Marshall each year) we estimate to about 100 animals (from Marshall) for the coming 5 years.

The exact amount of surplus animals cannot be predicted accurately, but we have received an average amount of 8 adult Beagle dogs per year. The number of eight control dogs would be sufficient for comparison with the 20 experimental dogs per year.

Overall, an estimated amount of 140 animals will be used to answer our research objectives for the next 5 coming years.

---

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Animals will undergo a maximum of 6 anesthetized experiments.

The re-use of animals over serial experiment will first greatly reduce the total number of animals required. Second, our research objectives require serial experiments to evaluate the contractile, electrophysiological and structural mechanisms of cardiac remodeling after creation of AV block as well as the reproducibility of TdP arrhythmia.

Finally, it has not been observed in our multiple previous studies using the CAVB dog model that animals experience a higher discomfort related to the serial experiments.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

---

## **D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

### **Replacement**

Cardiac arrhythmias are the result of complex expression of multiple factors at both cellular and (in vivo) whole-heart levels. Computer modelling is not suitable for this purpose because of its lack mimicking complexity of interaction and activation of ion channels, pumps and transporters. The modulation of their expression and activation by the mechanical activity of the heart (via electro-mechanical feedback systems) is not modelled with the current computer modelling. This is also the case for in vitro (e.g. cell culture) as well as ex-vivo models (Langendorff experiments). Moreover, in vivo experiments integrate the contribution of the autonomic nervous system, a known keyplayer in the occurrence of cardiac arrhythmias. As an example, Langendorff experiment, performed in isolated hearts, is a well scientifically validated technique but still requires the use of animal and does not integrate the autonomic nervous system contribution. To date, computer modelling and cellular models are not suitable and enough developed to totally replace in vivo experiments for the evaluation the efficacy of new anti-arrhythmic drug. Furthermore, these models remain however useful to complement in vivo experiments.

Our research objective evaluating new marker in arrhythmic susceptibility aims to test the relation between post-extrasystolic potentiation and occurrence of arrhythmia. This is not possible to assess in vitro since arrhythmias will require cell-cell connections to begin and propagate. In addition, we are interested in potentiation of contractility of the heart as a whole and the influence of these mechanical properties (e.g. PESP) at organ level on electrophysiology. In addition, computer modelling cannot replace this model, since the exact precise mechanism of ventricular arrhythmias is unknown. The design contains a pacing protocol which could possibly induce ventricular arrhythmia. Therefore this experiment would be unethical to test in patients and to expose these patients to this risk. In addition, an invasive catheter is introduced to correlate PESP of LV dP/dt to non-invasive PESP. This would also expose patients to undesirable risks when this invasive procedure is for research purposes only.

Finally, our third research objective (ventricular remodeling related to altered activation) is to evaluate the cellular electrophysiological changes and mechanisms responsible for the adaptation of the heart to altered ventricular activation. As they are unknown, a computer model cannot replace the animal procedure. A cellular model is also not sufficient, as it is the in vivo cardiac adaptation based on mechanical and electrical activation we are interested in. With a cellular model, we cannot mimic the precise regional forces for instance. RVA pacing is a frequently used treatment modality in human. However, it is unethical to expose patients to a pro-arrhythmic drug several times. Moreover, we need cardiac tissue to obtain insight in the underlying cellular mechanisms associated with the cardiac remodeling which we can't obtain from patients in a sufficient manner.

### **Reduction**

As mentioned above, reduction of the amount of animals will be achieved through the re-use of animals for several experiments. Moreover, several research objectives can be addressed within the same experiment and within the same animal. As an example, within a protocol evaluating a drug's anti-arrhythmic effect, a dofetilide experiment (susceptibility test) has to be performed in the first CAVB experiment. In this experiment, new markers of arrhythmic susceptibility can be measured at the same time. As a result, 2 research objectives can be addressed in 1 animal.

Altogether, the combination of re-use of animals and the investigation of research objectives within one single experiment greatly reduces the total amount of animals necessary.

See also Figure 5.

### **Refinement**

An acclimatization period of 2 weeks will expire before the conduction of the first experiment. Sedative premedication as well as analgesics and antibiotics will be respectively administered before and after experiment, to maximally reduce any stress, discomfort or risk of infection. Experiments will be performed under general anesthesia during which a heating mattress and saline solution administration will be provided during each anesthetized experiments to prevent occurrence of hypothermia and fluid depletion. An interval of 2 weeks will be kept between 2 consecutive experiments to allow animals to recover. Furthermore, animals will be daily visited and pampered by animal caretakers and at least once



a week by a member of our department (Article 9 or technician). Unless impossible, animals will be pair-housed for social interaction and cages will be enriched with toys. Animals will have daily access to the outdoor backyard of the animal facility.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

As mentioned before, an acclimatization period of 2 weeks will expire before the conduction of the first experiment. Sedative premedication as well as analgesics and antibiotics will be respectively administered before and after experiment, to maximally reduce any stress, discomfort or risk of infection. Experiments will be performed under general anesthesia during which a heating mattress and saline solution administration will be provided during each anesthetized experiments to prevent occurrence of hypothermia and fluid depletion. An interval of 2 weeks will be kept between 2 consecutive experiments to allow animals to recover. Furthermore, animals will be daily visited and pampered by animal caretakers and at least once a week by a member of our department (Article 9 or technician). Unless impossible, animals will be pair-housed for social interaction and cages will be enriched with toys. Animals will have daily access to the outdoor backyard of the animal facility.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Animals will be first premedicated, including analgesic (methadone), antibiotic (ampicilin) and sedative treatments to minimise stress before induction of anesthesia. Experiments will be performed under general anesthesia. Postoperative care will be provided including antibiotic (ampicillin) and analgesic (buprenorphine) treatments.

In case of infection associated with fever, proper antibiotic care will be provided with antipyretic drug.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Other adverse effects that may occur include heart failure (see below Humane endpoints) which incidence is expected to be very low (<5%), and infection, despite systemic (intravenously before and intramuscularly after experiment,) and local (around body of pacemaker and the pacing lead) administration of antibiotics.

Explain why these effects may emerge.

Ablation of the AV node results in bradycardia. In a very few cases, bradycardia can be severe and the contractile function of the heart may not compensate properly the drop of heart rate. As a result, signs of acute heart failure symptoms may be observed in less than 5%.

Infection is another adverse effect that may emerge related to the implantation of the pacemakers and the pacing lead, although being sterile at the time of procedure and concomitant antibiotics.

In animals implanted with a pacemaker and chronically paced, a lead dislocation may happen. This will not result in any additional discomfort. However, the lead will have to be reimplemented as soon as possible.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

In case of heart failure symptoms, diuretic treatment (furosemide) will be administered

### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Evaluation of heart failure:

- behavioral changes: defensive/fearful (1), decreased food intake and/or drinking (2)
- signs of heart failure: dyspnea (2), non productive cough(1), weight increase (despite decreased intake) (2), expanded abdomen (2), shivering (2), piloerection and cold skin(2), weak pulse (1), cardiac examination (decreased heart sounds, crackles) (2)

If the calculated score is 3 or more, the decision to euthanize the animal will be taken.

Indicate the likely incidence.

Our extensive experience with the CAVB dog indicates that incidence of heart failure in this model is relatively low (~5%)

Moreover, since this CAVB model displays an enhanced susceptibility to TdP arrhythmias, some animals (less than 5%) may exhibit a sudden cardiac death phenotype by spontaneously developing fatal ventricular fibrillation in the stable.

### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

#### **1. Evaluation of markers of susceptibility for arrhythmia (PESP)**

<b>Experiment</b>	<b>Procedure</b>	<b>Degree of discomfort</b>
Sinus rhythm and acute AV block	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Antibiotic (pre and post-operative)	Moderate

conditions	- Sedation (pre-operative)	
	General anesthesia: - induced intravenously - maintained by inhalation	
	Femoral artery and vein catheterization	
	Finapress© non-invasive pressure recording	
	AV node ablation	
	Dofetilide administration (under acute AV block)	
	Pacing protocols (before and after dofetilide)	
Chronic AVB experiments	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Antibiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	Moderate
	General anesthesia: - induced intravenously - maintained by inhalation	
	Femoral artery and vein catheterization	
	Finapress© non-invasive pressure recording	
	Dofetilide administration (under acute AV block)	
	Pacing protocols	
Last chronic AVB experiment	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Antibiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	Non-recovery
	General anesthesia: - induced intravenously - maintained by inhalation	
	Femoral artery and vein catheterization	
	Finapress© non-invasive pressure recording	
	Dofetilide administration (under acute AV block)	
	Pacing protocols	
	Termination by excision of the heart	

## 2. Evaluation of novel antiarrhythmic strategies

Experiment	Procedure	Degree of discomfort
Sinus rhythm Electrophysiological effects	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Antibiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	Moderate
	General anesthesia: - induced intravenously - maintained by inhalation	
	Femoral artery and vein catheterization	
	Drug administration intravenously	
	AV node ablation	
Chronic AVB experiment: Inducibility and suppressive antiarrhythmic test	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Antibiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	Moderate
	General anesthesia: - induced intravenously - maintained by inhalation	
	Femoral artery and vein catheterization	
	- Dofetilide administration intravenously - Antiarrhythmic drug administration	
Chronic AVB	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative)	Moderate

Inducibility and preventive antiarrhythmic test	experiment:	- Anitbiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	
	General anesthesia:	- induced intraveinously - maintained by inhalation	
	Femoral artery and vein catheterization		
	- Antiarrhythmic drug administration - Dofetilide administration intraveinously		
Last chronic AVB experiment	General anesthesia:	- induced intraveinously - maintained by inhalation	Non-recovery
	Femoral artery and vein catheterization		
	Termination by excision of the heart		

### 3. Ventricular remodeling related to altered activation

Experiment	Procedure	Degree of discomfort
Sinus rhythm and acute AVB conditions	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Anitbiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	Moderate
	General anesthesia: - induced intraveinously - maintained by inhalation	
	- Echocardiography - Cardiac imaging techniques - Pacemaker implantation	
	AV node ablation	
	Dofetilide administration	
Chronic AVB experiments	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Anitbiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	Moderate
	General anesthesia: - induced intraveinously - maintained by inhalation	
	- Echocardiography - Cardiac imaging techniques	
	Dofetilide administration	
Last Chronic AVB experiment	Premedication: - Analgesic (pre and post-operative) - Anitbiotic (pre and post-operative) - Sedation (pre-operative)	Non-recovery
	General anesthesia: - induced intraveinously - maintained by inhalation	
	- Echocardiography - Cardiac imaging techniques	
	Dofetilide administration	
	Termination by excision of the heart	

A control ECG will be recorded under awake conditions the day after each anesthetized experiments. The expected severity of this procedure is mild.

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Cellular experiments performed in cardiomyocytes isolated from animals are necessary to answer the research objectives 2. and 3.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2016.II.529.002
2. Titel van het project : Torsade de Pointes arrhythmia: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling
3. Titel van de NTS : Ontwikkeling van behandeling van hartritmestoornissen.

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 05-02-2016  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 17-02-2016 en 16-03-2016  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 19-02-2016 tot 04-03-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 20-04-2016

## 7. Eventueel horen van aanvrager

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

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 19-02-2016
- Strekking van vragen:

Algemeen

- De DEC verzoekt u de opmerkingen van de IvD te verwerken in uw aanvraag. Graag aandacht voor de controledieren aantallen onderbouwing.

### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Volgens de DEC lopen de verschillende doelstellingen uiteen, waardoor de DEC twijfels heeft of er sprake is van een toetsbare eenheid. De DEC adviseert u dan ook om voor wat betreft het onderwerp veiligheid (het testen van geneesmiddelen op inductie van hartritmestoornissen) een aparte aanvraag (eerste project) in te dienen. Bovendien adviseert de DEC u in het tweede project de samenhang tussen de verschillende doelstellingen duidelijker te beschrijven. In het kader van ons advies moet voor het veiligheidsproject ook het 3e vakje onder 2.1. aangekruist worden.
  - 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u te beginnen met het beschrijven van de pathogenese van de patiënten en vervolgens het diermodel te beschrijven en aan te tonen dat dit model een goed equivalent is voor de bevindingen bij de patiënten.
- Datum antwoord: 04-03-2016  
Strekking van de antwoorden:
- Het project is herschreven op basis van de adviezen van de DEC.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

### **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
  - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. In ontwikkelde landen zijn cardiovasculaire aandoeningen de grootste oorzaak van morbiditeit en mortaliteit, ondanks de beschikbare therapeutische mogelijkheden. Ongeveer de helft van de cardiovasculaire sterfte wordt veroorzaakt door ritmestoornissen. Wanneer er sprake is van een hartziekte/falen, zal het hart door de verhoogde stress die het ondervindt proberen zich aan te passen, zodat het zijn normale knijpfunctie kan behouden (remodelling). Deze aanpassingen maken het hart gevoelig voor ritmestoornissen. Een van de ritmestoornissen die kan ontstaan is de Torsade de Pointes (TdP) ritmestoornis. Wanneer deze ritmestoornis niet wordt beëindigd treedt ventriculaire fibrillatie op met de plotselinge dood als gevolg. De therapeutische toepassingen om ventriculaire fibrillatie te behandelen zijn beperkt. Een groot deel van de beschikbare medicatie die ritmestoornissen tegengaat geeft negatieve bijwerkingen op hartfunctie en elektrische geleiding, twee aspecten die al aangetast zijn tijdens hartfalen. De ontwikkeling van nieuwe en veilige therapeutische toepassingen om hartritmestoornissen tegen te gaan is van substantieel belang, omdat deze de morbiditeit en mortaliteit in patiënten die lijden aan cardiovasculaire aandoeningen terug kunnen dringen. Dit project onderzoekt parameters die de risico's voor ritmestoornissen voorspellen (doelstelling 1), nieuwe behandelingen om ritmestoornissen tegen te gaan (doelstelling 2) en de relatie tussen remodelling en aangepaste activatie van het ventrikel (doelstelling 3).
  
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De fysiologie van elektrische signaalgeleiding in het hart verschilt per diersoort. De elektrofysiologie van de hond komt het meest overeen met de humane situatie en wordt daarom veelvuldig gebruikt in onderzoek naar ventrikel remodelling en geassocieerde ritmestoornissen van het ventrikel. In het chronische atrioventriculaire blok (CAVB) model wordt de atrioventriculaire knoop verwijderd waardoor bradycardie optreedt. Chronische bradycardie in de hond leidt tot een remodelling van het hart welke vergelijkbaar is met remodelling die typerend is voor hartfalen bij de mens. Honden zijn na remodelling gevoelig voor het ontwikkelen van ritmestoornissen (TdP) wanneer zij worden blootgesteld aan dofetilide. Het CAVB model zal gebruikt worden om de drie verschillende – maar met elkaar samenhangende – doelstellingen te bereiken. Voor de eerste doelstelling zullen niet-invasief en invasief gemeten parameters worden onderzocht om het risico op ritmestoornissen te bepalen. Het onderzoeken van medicatie om hartritmestoornissen tegen te gaan (tweede onderzoeksdoel) zal plaatsvinden in honden die TdP ritmestoornissen vertonen. Om de relatie tussen remodelling en aangepaste activatie van het ventrikel te bepalen zal een serie experimenten in dezelfde hond worden uitgevoerd waarbij controle ritme en acute en chronische atrioventriculaire blok worden gerelateerd aan het ontstaan van ritmestoornissen door blootstelling aan dofetilide. De hartfunctie van de hond zal worden gecorreleerd aan de fase van remodelling. Een samenvattende omschrijving van de verschillende experimenten per doelstelling is weergegeven in tabel 1 (sectie 3.4.2). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager



over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Elke hond zal voor maximaal 6 experimenten worden ingezet. Het cumulatieve ongerief dat elk van de honden zal ondervinden in de verschillende experimenten wordt ingeschat als matig. Verwacht wordt dat ongeveer 5% van de honden het humane eindpunten zal bereiken door het ontwikkelen van hartfalen, en minder dan 5% plotselinge sterft ten gevolg van fatale ventrikel fibrillaties.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Complexe interacties op cel en orgaanniveau spelen een grote rol tijdens hartritmestoornissen. *In vitro* (celkweek), *ex vivo* (Langendorff opstelling) of computermodellen kunnen *in vivo* experimenten ondersteunen, maar zijn niet geavanceerd genoeg om *in vivo* experimenten te vervangen, mede door de interactie met het centrale zenuwstelsel. Voor het onderzoek naar nieuwe markers betrokken bij de gevoeligheid voor ritmestoornissen vraagt om cel-cel interactie voor de elektrische geleiding. Daarnaast zijn de mechanismen achter de elektrofysiologische veranderingen en de ventrikel remodelling nog niet duidelijk waardoor het niet mogelijk is dit te onderzoeken met een computermodel.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Met behulp van gegevens uit eerder uitgevoerde vergelijkbare experimenten zal voorafgaand aan de experimenten het benodigde aantal dieren middels een poweranalyse bepaald worden. Het onderzoek is zo opgezet dat honden in verschillende opeenvolgende experimenten kunnen worden ingezet, en dat per experiment en binnen één hond meerdere onderzoeksvragen kunnen worden onderzocht. Door deze opzet zijn aanzienlijk minder honden nodig dan wanneer elke onderzoeksvraag per hond in een apart experiment onderzocht zou worden.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeksgroep heeft uitgebreide ervaring met het CAVB hondenmodel en het beoordelen van de effecten van medicijnen op ritmestoornissen. Om stress en ongemak zoveel mogelijk te beperken worden adequate en op de experimentele handelingen afgestemde analgesie- en anesthesieprotocollen toegepast. Om het risico op infectie tot een minimum te beperken worden antibiotica verstrekt. Door de honden tijdens een experiment onder anesthesie op een warmtemat te leggen en een fysiologische zoutoplossing toe te dienen worden onderkoeling en uitdroging voorkomen. Tussen twee experimenten krijgen de honden twee weken de tijd om te herstellen. Gedurende deze periode worden gezondheid en welzijn van de honden nauwlettend gemonitord.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

De DEC oordeelt unaniem dat de doelstellingen van het project het voorgestelde gebruik van honden rechtvaardigt. De huidige medicijnen tegen hartritmestoornissen kunnen hartritmestoornissen niet goed voorkomen. Daarnaast kan deze medicatie als bijwerking juist hartritmestoornissen opwekken. De DEC is van mening dat dit voorgestelde onderzoek naar nieuwe parameters om het risico op hartritmestoornissen beter te voorspellen en nieuwe behandelingen om ritmestoornissen tegen te gaan van groot belang is voor het ontwikkelen van nieuwe en verbeterde behandelingen van patiënten met hartfalen die het risico lopen hartritmestoornissen te ontwikkelen. Het gebruik van honden is in de ogen van DEC noodzakelijk voor het onderzoek met betrekking tot deze doelstellingen. De mogelijkheden tot vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven zijn onderzocht en optimaal toegepast binnen de onderzoeksstrategie. Daarnaast zijn de humane eindpunten zo bepaald dat de honden onnodig ongerief bespaard blijft. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstellingen opweegt tegen het matige ongerief dat de honden in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de honden ethisch aanvaardbaar is.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

#### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002016531

**Bijlagen**

2

Datum 29 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 29 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016531. 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: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 juni 2016

Geplande einddatum: 31 mei 2021

Titel project: Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular Remodeling

Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van anti-aritmische therapieën, pro-aritmische screening van medicatie en risicopredictie van hartritmestoornissen

Naam DEC: DEC Utrecht

Postadres DEC: 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utrecht  
Datum: 28 april 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016531  
**Bijlagen**  
2

Datum 29 april 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 29 april 2016  
Vervaldatum: 29 mei 2016  
Factuurnummer: 16700531  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016531	€ 935,00

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.



[Redacted]

**Van:** [Redacted]  
**Verzonden:** donderdag 26 mei 2016 10:58  
**Aan:** 'info@zbo-ccd.nl'  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** RE: vraag bij AVD115002016531

Geachte [Redacted]

Namens de onderzoeker [Redacted] kan ik u melden dat zowel reuen als teven worden ingezet in het project. (zie emails hieronder).

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

[Redacted] | [Redacted] | [Redacted] | [Redacted] | [Redacted] | [Redacted]  
[Redacted] Utrecht  
[Redacted] | [Redacted] | [Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

---

**Van:** [Redacted]  
**Verzonden:** donderdag 26 mei 2016 10:04  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** Re: vraag bij AVD115002016531

Dear [Redacted]

We will indeed use both genders (male and female dogs) for our project.

Kind regards,

[Redacted]

---

[Redacted]  
[Redacted]  
University Medical Center Utrecht  
[Redacted]  
The Netherlands  
Tel: [Redacted]  
Fax: [Redacted]

E-mail: [redacted]

On 23 May 2016, at 16:44, [redacted] wrote:

Dear [redacted]

To be sure I send this email also in English to you and [redacted]  
The CCD has an additional question:

“Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk of u zowel reuen als teven inzet voor uw project. Kunt u dit nog verduidelijken?”

“From your application is not clear or you use both males and females in your your project. Can you clarify?”

Can you send your reply to me?

Then I will forward your reply to the CCD.

Kind regards,

[redacted]

[redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted]  
[redacted] Utrecht  
[redacted] | [redacted] | [redacted]  
[redacted] [redacted]  
<image003.png>

---

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** maandag 23 mei 2016 16:09  
**Aan:** [redacted]  
**Onderwerp:** vraag bij AVD115002016531

Geachte [redacted], Leden van IvD Utrecht,

Bij de behandeling van uw aanvraag tot project vergunning hebben wij nog een vraag. Het betreft uw project “Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling” met aanvraagnummer AVD115002016531. Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk of u zowel reuen als teven inzet voor uw project. Kunt u dit nog verduidelijken?

Met vriendelijke groet, [redacted]

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

.....  
**Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag**  
.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

*De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.*

*Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.*

---

*This message may contain confidential information and is intended exclusively for the addressee. If you receive this message unintentionally, please do not use the contents but notify the sender immediately by return e-mail. University Medical Center Utrecht is a legal person by public law and is registered at the Chamber of Commerce for Midden-Nederland under no. 30244197.*

*Please consider the environment before printing this e-mail.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

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

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

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

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016531

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 8 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 29 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular Remodeling" met aanvraagnummer AVD115002016531. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 mei 2016 hebben wij u gevraagd of u beide geslachten inzet in uw project. Op 26 mei 2016 heeft u de vraag beantwoord: u zet beide geslachten in voor uw project. Dit is toegevoegd aan het dossier en meegewogen in de besluitvorming.

### **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 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 "Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular Remodeling" starten. De vergunning wordt afgegeven van 8 juni 2016 tot en met 31 mei 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopdossier bijgehouden worden.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 20 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies

van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden twee aanvullende voorwaarden gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

### **Bezwaar**

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

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

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

### **Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 8 juni 2016 tot en met 31 mei 2021, voor het project "Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular Remodeling" met aanvraagnummer AVD115002016531, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 29 april 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 29 april 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 29 april 2016
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 20 april 2016, ontvangen op 29 april 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 26 mei 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling	Honden (Canis familiaris) / mongrel dogs, Marshall USA	100	Matig	
Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular remodeling	Honden (Canis familiaris) / beagles	40	Licht	Honden surplus voor het verzamelen van verse cardiomyocyten

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

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

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

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

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

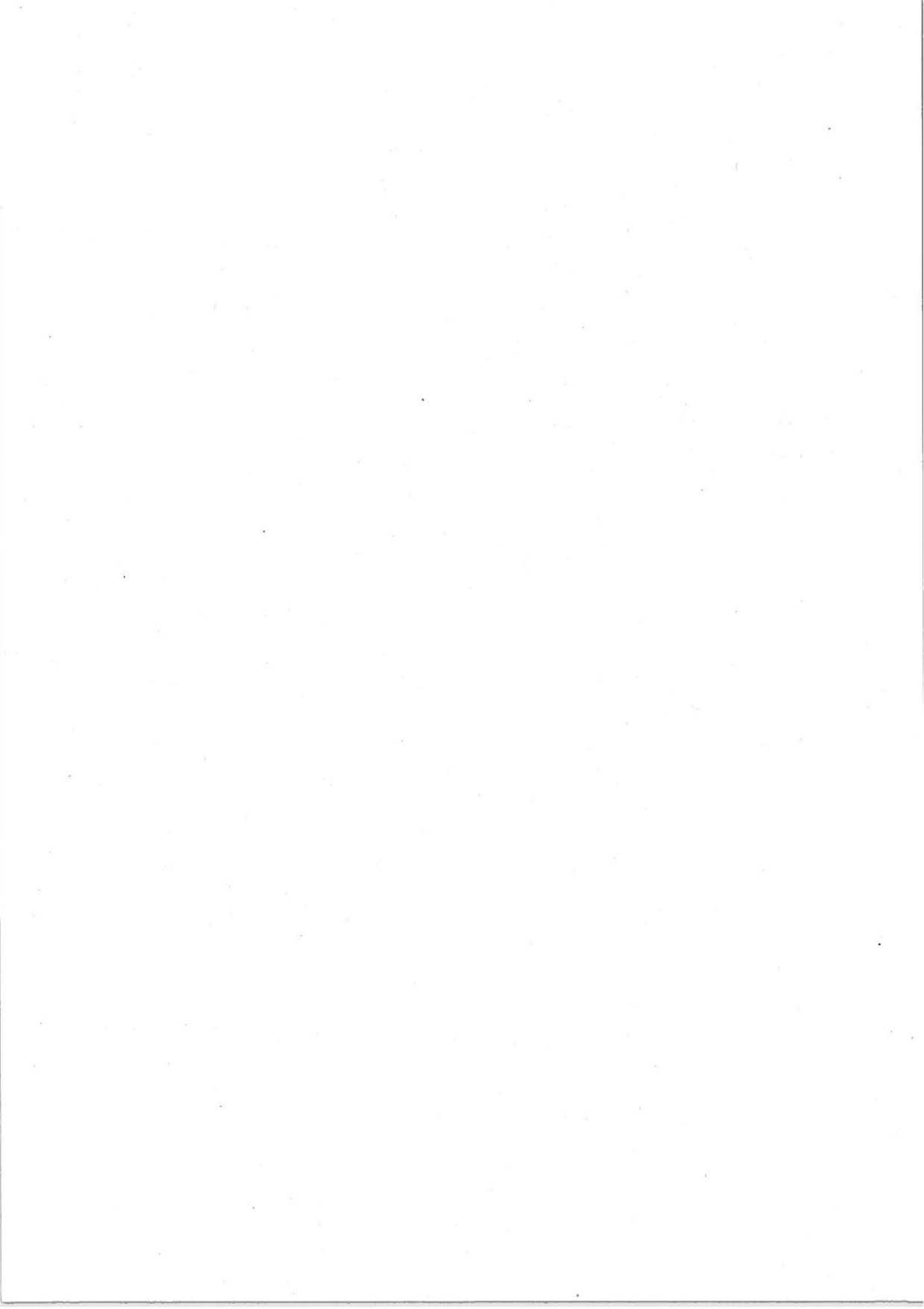
Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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


### **Levensloopdossier**

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopdossier bijgehouden worden.







**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 16 juni 2016 12:38  
**Aan:**   
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD115002016531

Geachte DEC Utrecht,

Op 29-04-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Torsade de Pointes arrhythmias: proarrhythmogenesis, antiarrhythmic strategies and ventricular Remodeling' met aanvraagnummer AVD115002016531.

Wij hebben de onderzoeker gevraagd of beide geslachten dieren worden ingezet.

De CCD heeft besloten uw advies te volgen en deze aanvraag te vergunnen. De aanvrager is van dit besluit op de hoogte gesteld.

Aan de vergunning zijn twee algemene voorwaarden verbonden.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

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

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)