

<b>Inventaris Wob-verzoek W17-17</b>		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>			
<b>nr.</b>	<b>Documenten 20172348</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>10.1.c</b>	<b>10.2.e</b>	<b>10.2.g</b>	<b>11.1</b>
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x	x	x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag 1				x		x		
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw			x					
10	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw				x	x	x	x	
11	Verzoek aanvulling aanvraag 2				x		x		
12	Niet-technische samenvatting nieuwst	x							
13	Bijlage beschrijving dierproeven nieuwst				x	x	x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x		

29 AUG. 2017



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <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 11800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Academic Medical Center Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>3 4 3 3 6 2 7 7 7</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7									
Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Meibergdreef</td> <td>31</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>1105AZ</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL68RABO0136166741</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Meibergdreef	31	Postbus			Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam	IBAN	NL68RABO0136166741		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC	
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31															
Postbus																	
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam															
IBAN	NL68RABO0136166741																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Functie	[REDACTED]	Afdeling	[REDACTED]	Telefoonnummer	[REDACTED]	E-mailadres	[REDACTED]					
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]																
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Functie	[REDACTED]	Afdeling	[REDACTED]	Telefoonnummer	[REDACTED]	E-mailadres	[REDACTED]					
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]																
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?
- |   |
|---|
| <input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nee   |

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 1 . 2 0 1 8 |
| Einddatum  | 3 1 . 1 2 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |   |
|---|
| Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |  |
|--|
| Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                 |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC    | DEC AMC         |
| Postadres   | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres |                 |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- |                                     |  |      |
|-------------------------------------|--|------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035,00 | Lege |
| <input type="checkbox"/>            | Wijziging €                                  | Lege |
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- |                                     |                             |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/>            | Via een eenmalige incasso   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Na ontvangst van de factuur |
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondertekende 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	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Amsterdam
Datum	20-08-2017
Handtekening	[REDACTED]



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

samenhangt met de kans om een bepaalde ziekte of afwijking te ontwikkelen (obesitas, suikerziekte, hoge bloeddruk, ritmestoornissen, etc.). Zo hebben "genome-wide association studies" (GWAS) nucleotide variaties (SNPs; single nucleotide polymorphisms) in de bevolking gevonden die zijn geassocieerd met hartfunctie (bepaald door middel van ECG) en ziekteverloop na schade (infarct). Deze variaties in het genoom blijken meestal in niet-eiwit coderend DNA te zitten. Ons genoom bestaat voor 98% uit niet-coderend DNA dat elementen bevat die bepalen wanneer, waar en hoe sterk genen tot expressie komen. De varianten hebben waarschijnlijk een invloed op de functie van zulke regulatoire DNA elementen.

Terwijl GWAS studies het grote belang van regulair DNA voor ziekteprocessen in de mens onweerlegbaar hebben vastgesteld, laten deze studies niet zien 1) welke specifieke varianten de ziektekans beïnvloeden en 2) hoe deze varianten de functie van organen beïnvloeden (██████████, ██████████ ██████████ ██████████). Daarnaast is de functie van dat regulatoire DNA in de regulatie van genexpressie, orgaanontwikkeling, homeostase en ziekteverloop na hartschade nog nauwelijks begrepen. Een belangrijk aspect hierbij is dat het onbekend is welke genen door de regulatoire elementen (uit de GWAS) worden gereguleerd en op welke manier, terwijl juist deze kennis nodig is voor het begrip van het ziektemechanisme en eventueel daaruit voorkomende aangrijpingspunten oplevert voor voorspelling, diagnose of behandeling.

Dit onderzoek richt zich specifiek op het achterhalen van de functie van regulatoire elementen en genen in hartontwikkeling en hun rol in boezemfibrilleren (5/1000 mensen; 6% van mensen van 75 jaar en ouder; met verhoogde kans op herseninfarct), kamer-ritmestoornissen (plotse hartdood) en aangeboren hartafwijkingen (7/1000 pasgeborenen; in Nederland 65.000 totaal en 1300-1400 per jaar) en na een hartinfarct (dagelijks krijgen 80 mensen een hartinfarct waarvan er 15 overlijden). Daarnaast ontwikkelen veel mensen ritmeproblemen zoals bradycardie als gevolg van falen van geleidingssysteem onderdelen (bijvoorbeeld sinusknop).

Volgens de laatste inzichten worden deze hartziekten veroorzaakt door een combinatie van verschillende mutaties/varianten in genen en regulatoire DNA elementen, al dan niet in samenspel met omgevingsfactoren. Daarnaast is er een onverwacht grote overeenkomst gevonden in de genen en variatiegebieden die geassocieerd zijn met hartontwikkeling, ritmestoornissen en hartziekten. Zo veroorzaakt variatie in ██████████ boezemfibrilleren en geleidingsvertraging, veroorzaken ██████████ (aangeboren hartafwijkingen) en ritmestoornissen, en veroorzaken ██████████ volledige verstoring van hart en geleidingssysteem ontwikkeling (██████████). Dit voorbeeld laat ook het grote dosis afhankelijke effect zien van een en hetzelfde genproduct op het fenotype. Een ander voorbeeld van een gen gevonden in Genome Wide Association Studies (GWAS) dat betrokken is bij hartritmerregulatie en hartontwikkeling is ██████████. Deze factor is tevens een klinisch relevante biomarker voor hartfalen. Wanneer het gen volledig wordt uitgeschakeld ontstaan hartafwijkingen (██████████), maar wanneer het gen alleen in endocard cellen wordt uitgeschakeld, ontwikkelen de muizen ritmestoornissen, mitraalklep afwijkingen en hartfalen (██████████). Wanneer ██████████ in de cardiomyocyten wordt uitgeschakeld ontwikkelen de muizen normaal maar gaan ze binnen enkele dagen na een geïnduceerd hartinfarct plotseling dood. Dit snelle beloop van de ziekte kan worden ondervangen door een collageen-patch geïmpregneerd met ██████████ eiwit op het infarct aan te brengen (██████████). GWAS hebben genetische varianten geïdentificeerd die een verband laten zien tussen hartinfarct en ventriculaire ritmestoornissen (██████████).

Hartontwikkeling en herstel na een hartaanval liggen in elkaars verlengde. In muizenpups tot een leeftijd van 7 dagen na de geboorte regenereert het hart volledig na een hartinfarct of apex resectie (██████████). Ook in de mensen lijkt deze regeneratieve response tijdens de eerste levensjaren te bestaan, aangezien een baby met een massief hartinfarct herstelde zonder enige restschade (██████████). In oudere dieren is deze regeneratieve response sterk verlaagd, waardoor in het infarct niet voldoende nieuwe hartspiercellen worden gevormd maar een litteken (██████████). Volwassen hartspiercellen blijken wel terug te vallen op hartontwikkelingsmechanismen, maar

slagen er toch niet in om te regenereren. Echter, recent onderzoek heeft laten zien dat geforceerde activering van hartontwikkelingsfactoren zoals [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] resulteert in sterk toegenomen regeneratie van het beschadigde volwassen hart.

De muis is een goed model voor het bestuderen van genetische factoren die een rol spelen bij de ontwikkeling van organen zoals het hart, en bij ziektes zoals hart- en vaatziekten. Daarbij kunnen ziektes en aangeboren afwijkingen in de mens veroorzaakt door modificaties in het genoom gemodelleerd worden in genetisch gemodificeerde muizen. Recent hebben we gevonden dat een enkele nucleotide variant ([REDACTED] die veel voorkomt in de populatie (4 op de 10 mensen zijn heterozygote drager) de activiteit van een [REDACTED] (gen voor belangrijkste natriumkanal in het hart) verstoort. Hierdoor bleek de expressie van [REDACTED] verlaagd te worden en de gevoeligheid voor ritmestoornissen toe te nemen ([REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]). Dit onderzoek illustreert het translationele karakter van dit fundamentele onderzoek. Van een variant uit GWAS studies (mens) wordt in in vitro en in diermodellen (muis) vastgesteld dat, en vervolgens hoe, deze de functie van het hart beïnvloedt. Momenteel wordt bekeken of de variant in de kliniek kan worden meegenomen in de risicobepaling voor bepaalde fatale ritmestoornissen. Dit onderzoek vond noodzakelijkerwijs deels plaats in muizenmodellen, omdat deze elementen functioneren in een strikt weefsel en context afhankelijke manier die niet betekenisvol nagebootst kan worden in cel/weefselkweek.

Het hier beschreven onderzoek is fundamenteel van karakter, maar zal ook leiden naar toegepast onderzoek. We bestuderen de rol van genen en (mogelijk) regulatoire elementen in de ontwikkeling, functie, ziekte verloop en regeneratie van het muizenhart, voor en na de geboorte. Specifieke genen/elementen worden gemodificeerd in muizen om het mechanisme van hun functie te bestuderen, en te extrapoleren naar hun functie in de mens. Aangezien tegenwoordig met behulp van CRISPR/Cas9 zeer efficiënte genetische modificaties in het genoom van de muis gemaakt kunnen worden, kunnen er modellen gemaakt worden met dezelfde genetische afwijkingen die in patiënten gevonden worden. Met behulp van deze techniek kan er effectief onderzoek naar aangeboren hartafwijkingen en hart- en vaatziekten plaatsvinden. We verwachten mechanismen en genen te vinden die door menselijk handelen kunnen worden beïnvloed ("druggable"), en zich dus lenen voor de ontwikkeling van behandelingen.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

#### **Doelstelling:**

Het doel van dit project is om genetische elementen ([REDACTED]) te identificeren die nodig zijn voor de ontwikkeling en de (elektrische) functie van het hart, en het onderliggende mechanisme van hun functie te achterhalen en de regeneratieve respons na een hartinfarct. Daarmee leren we hoe bepaalde hartafwijkingen, ritmestoornissen en verschillen in ziekteverloop ontstaan, en hoe en waarom bepaalde in de bevolking voorkomende genetische variaties / mutaties hartafwijkingen, ritmestoornissen en verschillen in herstel na hartschade veroorzaken. Uiteindelijk resulteert dit in verbeterde bepaling van risico en diagnose, en in inzicht in onderliggende mechanismen en identificatie van betrokken genen waarop behandeling ontwikkeld kan worden.

We richten ons specifiek op 5 doelgebieden:

1. de functie van het geleidingssysteem. Het geleidingssysteem bestaat uit weefsels die het elektrische signaal maken en doorgeven aan de boezems en kamers, en zo tempo en coördinatie van samentrekken bepalen.
2. de functie van het atrium en boezemfibrillatie. Boezemfibrilleren kent verschillende oorzaken waarvan het onderliggende mechanisme slechts deels of niet begrepen is.
3. gevoeligheid voor ritmestoornissen van de kamers, met name de rechterkamer uitstroom, waar bij de

mensen veel ritmestoornissen ontstaan.

4. het ontstaan van aangeboren hartafwijkingen. Dit betreft zowel structurele afwijkingen (zoals verkeerde aansluiting grote slagaders op het hart) als de aanleg tot ritmestoornissen (bijvoorbeeld kamer pre-excitatie).

5. Regeneratie na hartschade. Tijdens een hartinfarct sterven door een lokale afsluiting van een coronairvat hartspiercellen, die bijna niet regenereren maar grotendeels worden vervangen door littekenweefsel.

De modificaties die we willen bestuderen worden gemaakt op basis van humaan genetische studies, zoals GWAS, waarin varianten en mutaties gevonden zijn die hartfunctie en ontwikkeling beïnvloeden/verstoren. We zullen beginnen met de belangrijkste varianten en mutaties die afwijkingen veroorzaken uit de literatuur, ons netwerk of onze eigen genetische studies. [REDACTED]

[REDACTED]. Additionele regio's zullen volgen. Van al deze gebieden wordt op basis van literatuur en ons vooronderzoek verwacht dat ze een rol spelen in de regulatie van deze en andere genen die nodig zijn voor het reguleren van hartontwikkeling, prikkelgeleiding en geleidingssysteem functie.

#### **Haalbaarheid:**

We hebben inmiddels meer dan 20 jaar ervaring met het maken en onderzoeken van genetisch gemodificeerde muizen, verkregen via klassieke modificatie methoden (via gemodificeerde embryonale stamcellen, directe DNA injecties in zygoten) en recent (sinds 2 jaar) via gene editing (TALEN; CRISPR-Cas9). Een van onze analisten is gespecialiseerd in het uitvoeren van de operatie waarbij door middel van het afbinden van de kransslagader (LAD) hartinfarct wordt geïnduceerd. Voor alle voorgestelde experimenten is de benodigde expertise en financiering aanwezig. Verder hebben wij en anderen reeds aangetoond dat bepaalde varianten in regulatorisch DNA en mutaties in genen zowel aangeboren hartafwijkingen, ritmestoornissen als een gewijzigd ziekteverloop kunnen veroorzaken (zie punt **3.1 Achtergrond**). We kunnen niet voorspellen of, en op wat voor manier het genomische element van interesse betrokken is bij de bovenbeschreven ziektebeelden. Wel zullen we aan de hand van bioinformatische analyse en in vitro experimenten deze elementen voorselecteren om de kans dat ze belangrijk blijken te zijn te verhogen. We schatten in dat de voorgestelde proeven haalbaar zijn om te doen omdat ze passen bij een groepsgrootte van ongeveer 5 verschillende onderzoekers (AIO's, postdocs en analisten). We hebben de afgelopen jaren uitgebreide ervaring opgebouwd wat betreft de hoeveelheid proeven en dieren die door de onderzoekers gebruikt (kunnen) worden. Hierdoor is dit project in zijn totaliteit zeer haalbaar.

### **3.3 Belang**

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

Maatschappelijk belang:

Aangeboren hartafwijkingen behoren tot de meest-voorkomende aangeboren afwijkingen (7/1000 pasgeborenen; in Nederland 65.000 totaal en 1300-1400 per jaar). Daarnaast ontwikkelen veel mensen ritmeproblemen zoals bradycardie (te trage hartslag als gevolg van natuurlijke pacemaker of atrioventriculaire knoop defecten), kamerfibrilleren (met plotse dood tot gevolg) of boezem fibrilleren (5/1000 mensen; 6% van mensen van 75 jaar en ouder) met verhoogde kans op herseninfarct. Dagelijks krijgen 80 mensen een hartinfarct waarvan het ziekteverloop sterk varieert en er zelfs 15 overlijden. Identificatie van de veroorzakende varianten (en mutaties) geeft de mogelijkheid om de kans op ziekte te voorspellen. Identificatie van de genen/genproducten die beïnvloed worden en een rol spelen bij de ziekteprocessen bieden aanknopingspunten voor het verbeteren van prognose en behandelingsmethoden.

Wetenschappelijk belang:

Deze klinische problemen hebben als overeenkomst dat de kans op het ontwikkelen ervan sterk wordt



beïnvloed door variaties in ons genoom, en dat de variaties worden gevonden in overeenkomstige gebieden van het genoom. Variaties en mutaties die deze ziektes veroorzaken worden intensief gezocht. Echter, deze studies leren ons niet welke variaties er wel en niet toe doen, en hoe de variaties die er wel toe doen hun effect veroorzaken. Deze lacune tussen variatiedetectie en mechanismebegrip verhindert gebruik van deze kennis. Het beantwoorden van deze vragen maakt het mogelijk om te achterhalen welke genproducten een rol spelen in deze ziekten, en via welk mechanisme.

De wetenschappelijke inhoud en het maatschappelijk belang van het onderzoek binnen onze onderzoeksgroep wordt beoordeeld middels 'peer-review' procedures en is in detail getoetst door internationale onderzoekers die toonaangevend zijn in het cardiovasculaire, ontwikkelings- en genetisch onderzoeksveld. Al deze projecten worden op zowel wetenschappelijke kwaliteit als maatschappelijk belang zeer uitgebreid beoordeeld door de wetenschapscommissies van de betreffende instanties, zoals de Nederlandse Hartstichting, NWO of de EU. Deze maken hiervoor gebruik van (inter)-nationale reviewers en maatschappelijke klankbordgroepen.

Verantwoording voor dit onderzoek wordt afgelegd naar o.a. de Nederlandse Hartstichting, de Europese Unie, maar ook naar de Raad van Bestuur van het AMC in de vorm van het garanderen van voldoende maatschappelijke-, gezondheids- en wetenschappelijke impact en het garanderen van het goed verlopen van promotie trajecten van promovendi.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

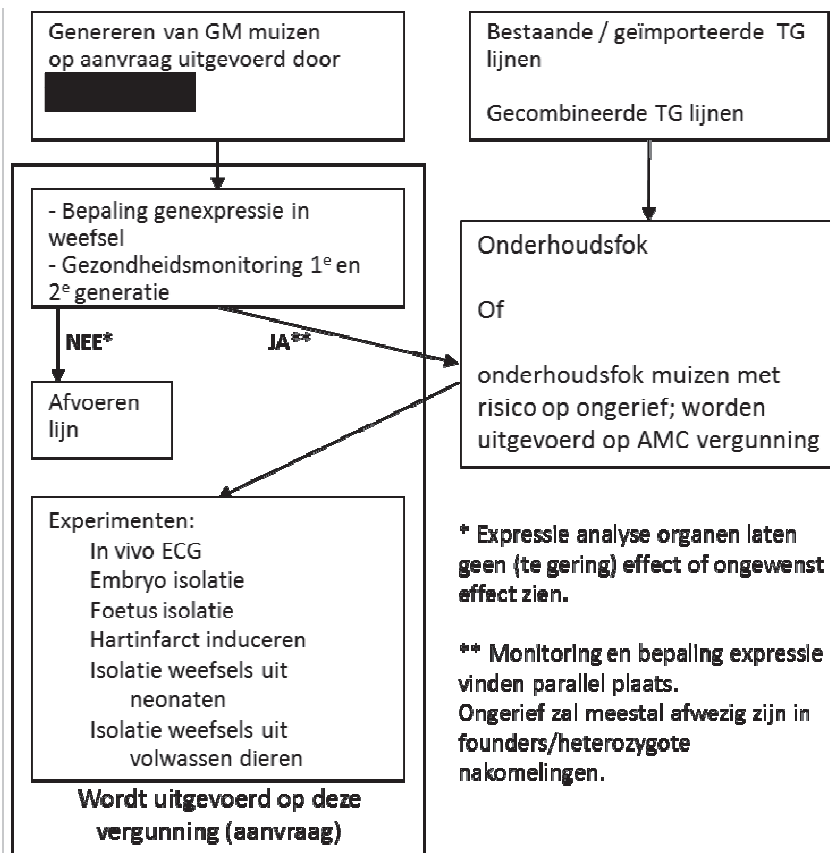
De onderzoekstrategie wordt weergegeven in figuur 1.

Humaan genetische onderzoeken (GWAS, mutatie screens etc.) ontdekken klinisch relevante varianten en mutaties ( ). Deze varianten/mutaties verstoren mogelijk hartontwikkeling of hartfunctie. We zullen met behulp van bioinformatica een voorspelling doen over de mogelijke functie van deze varianten / mutaties. We richten ons op vijf gerelateerde onderwerpen: geleidingssysteem functie, boezemfibrilleren, kamer-ritmestoornissen, aangeboren hartafwijkingen en regeneratie na hartschade.

Voorts zullen we door middel van genome editing (CRISPR/Cas9) een gewenste verandering in het genoom van de muis aanbrengen.

. Het genereren van transgene lijnen wordt uitgevoerd door de . Voor de injecties is een vergunning. Muizenlijnen met reeds vervaardigde bruikbare modificaties zullen geïmporteerd worden.

Met behulp van genotypering (PCR) wordt het aantal founders vastgesteld onder de pups die geboren worden uit de geïnjecteerde zygoten. Deze founders worden overgedragen op dit protocol voor verdere karakterisering van de lijnen. Deze muismodellen zijn heterozygoot voor het transgen en hebben mogelijk al wel een kleine (meetbare) verandering in genexpressie, maar doorgaans geen merkbaar effect op fenotype (en welzijn). Van elk type modificatie willen we minimaal twee onafhankelijke lijnen onderzoeken om te bevestigen dat het fenotypische effect veroorzaakt wordt door de modificatie, en niet door "off target" modificaties die kunnen ontstaan bij het toepassen van CRISPR/Cas9 (tot nu toe rapporteert de literatuur weinig problemen met onverwachte merkbare fenotypische effecten als gevolg van eventuele off target modificaties, hetgeen ook blijkt uit onze eigen ervaring; tientallen lijnen gegenereerd, geen bijeffect waargenomen).



Figuur 1.

Onder deze vergunning wordt de gezondheid van de muizen van de 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> generatie fok van de gegenereerde lijn gemonitord om vast te stellen of de genetische modificatie ongerief voor de muizen oplevert. Als er geen ongerief wordt vastgesteld, wordt de lijn verder gefokt. Als er wel ongerief wordt vastgesteld dan zal de lijn verder gefokt worden op de generieke AMC-vergunning voor fokken met risico op ongerief. Lijnen die worden geïmporteed of worden gecombineerd van bestaande lijnen gaan direct naar onderhoudsfok.

Voor nieuw-gegenereerde lijnen geldt dat ze al worden onderzocht als heterozygoot gedurende de gezondheidsmonitoring (dus 1 gemodificeerd allel, 1 wildtype allel). Weefsels wordt geïsoleerd waarna genexpressieniveaus en expressiepatronen worden bepaald van een panel van voor die modificatie specifieke genen. Als geen verandering in genexpressie aanwezig is, zal de lijn getermineerd worden. Als genexpressie wel is veranderd dan zullen vervolggexperimenten gedaan worden die afhangen van het verwachte effect van de aangebrachte genetische modificatie en de uitslag van het initiële onderzoek.

De experimentele opzet zorgt voor een minimum aan ongerief; De lijnen worden gekruist om homozygote nakomelingen te genereren (fokprotocol [redacted]). Bij de dieren wordt eerst een ECG afgenomen en vervolgens worden ze zonder verdere experimentele handelingen gedood en de organen geïsoleerd voor histologische, structurele, genomische en elektrofysiologische bepalingen. Daarnaast zullen controle, heterozygote en homozygote embryo's en foeten worden geïsoleerd (zie Figuur 2) voor histologische, structurele, genomische en elektrofysiologische bepalingen. De uitkomst van deze screening laat het effect van het gemodificeerde regulatoire DNA of gen zien, en geeft inzicht in de rol van de variant/het gen in hartontwikkeling en ritmestoornissen. In deze lijnen wordt vervolgens in volwassen dieren een hartinfarct geïnduceerd en het regeneratie proces (response van het hart en vorming infarct) op verschillende tijdpunten, maar tot maximaal 3 maanden, na de ingreep bestudeerd.

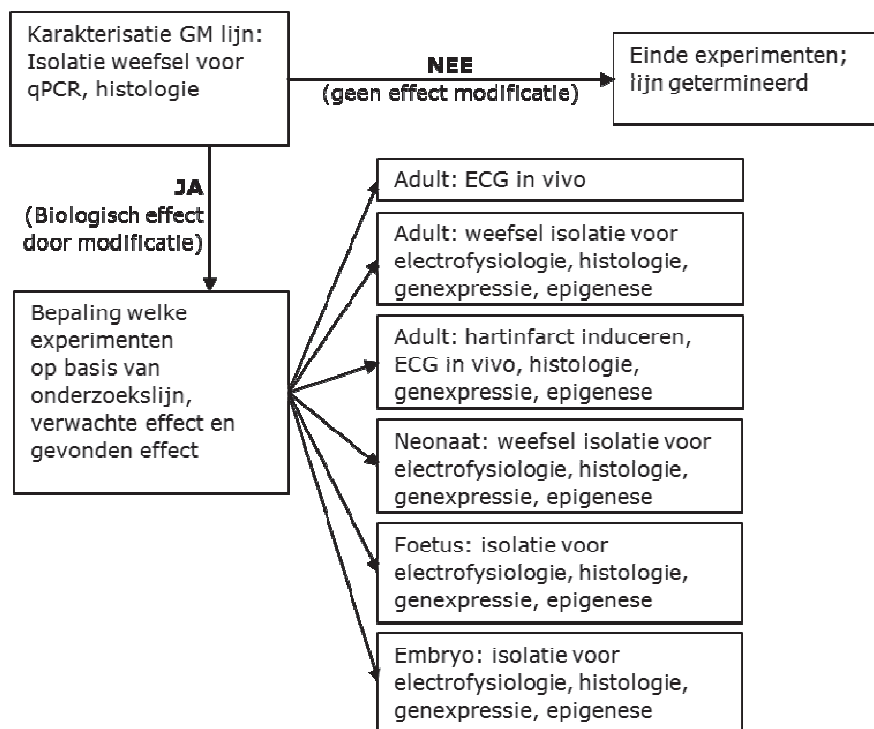
### 3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij

gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Het doel van dit project is om de functie vast te stellen van genetische elementen (regulatorische elementen, genen) in de ontwikkeling, functie en ziekteverloop van het hart.

Van elke transgene lijn zal eerst van heterozygote gemodificeerde dieren weefsel van interesse worden geïsoleerd, zonder dat er voorafgaand handelingen met de muizen worden uitgevoerd (Figuur 2). Dit weefsel wordt gefixeerd voor histologie en uit dit weefsel wordt RNA geïsoleerd om met qPCR te bepalen welk effect de modificatie heeft op genexpressie. Als de genetische modificatie geen-, of een zeer klein, effect heeft op een van de eigenschappen die hier bepaald worden dan zal de lijn afgevoerd worden.

In transgene lijnen waar een effect op genexpressie is aangetoond, zullen vervollexperimenten worden gedaan die afhangen van 1) de verwachting van het effect van de modificatie op hartontwikkeling en prikkelgeleiding, en 2) het gevonden effect op genexpressie.



Figuur 2

Bij een verwacht effect op de functie van het geleidingssysteem zullen er ECGs worden uitgevoerd op volwassen hetero- en homozygote muizen. Daarnaast zullen er elektrofysiologische experimenten (optical mapping en patch clamp) experimenten worden uitgevoerd op geïsoleerde harten. Verder zullen embryo's en foeten worden geïsoleerd om de effecten van de modificatie tijdens hartontwikkeling te bestuderen. Deze embryo's en foeten worden onderzocht op anatomie genexpressie en elektrofysiologische.

Bij een verwachte rol van modificaties in boezemfibrilleren zullen *in vivo* ECGs worden afgenomen van hetero- en homozygote dieren. Daarnaast zal weefsel geïsoleerd worden van volwassenen en neonaten voor *ex vivo* ECG, optical mapping, patch clamp experimenten, genexpressiebepaling (■■■-■■■) en epigenetische parameters (■■■■■).

Bij een verwacht effect van modificaties op de elektrofysiologische functie van de kamers zullen *in vivo* ECGs worden afgenomen op hetero- en homozygote dieren. Daarnaast zal weefsel geïsoleerd worden van adulten en neonaten voor *ex vivo* ECG, optical mapping, patch clamp experimenten, genexpressiebepaling (■■■■■) en epigenetische parameters (■■■■■).

Bij een verwacht effect op hartontwikkeling zal er zowel op embryonaal, foetaal, neonataal als adult niveau gekeken worden naar het effect van de modificatie. Weefsels worden geïsoleerd van dieren na geboorte zonder voorafgaande handeling voor morfologische/histologische etc. analyses, en bepalingen van epigenetische parameters [REDACTED] Vrouwtjes worden zwanger gemaakt en heterozygote en homozygote embryo's en foeten worden geïsoleerd en gedood, en onderzocht als beschreven voor de weefsels van volwassen dieren.

Bij een verwacht effect op het ziekteverloop zal in volwassen wildtype, heterozygote en homozygote dieren chirurgische een hartinfarct worden geïnduceerd. Op verschillende tijden na de inductie wordt een in vivo ECG gemaakt en weefsels geïsoleerd. Het weefsel wordt gebruikt voor morfologische/histologische analyses, en bepalingen van epigenetische parameters [REDACTED] De varianten of mutaties gevonden bij mensen met de ritmestoornissen, hartdefecten en ziekteverloop vertonen overlap. Om de aspecten van de complexe genetische basis van hartafwijkingen, ritmestoornissen en ziekteverloop te modelleren zullen lijnen met verschillende modificaties onderling gekruist worden om de combinatie van genetische modificaties te kunnen analyseren. Van deze samengestelde lijnen wordt opnieuw het ongerief ingeschat gedurende de eerste twee generaties, en bepaald wat de vervolggexperimenten zijn op basis van 1) de verwachting van het effect van de modificatie op hartontwikkeling, prikkelgeleiding, etc. en 2) het gevonden effect op genexpressie.

---

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

---

In dit project onderzoeken we de rol van regulatoire DNA elementen en kandidaat genen in hartontwikkeling en hartziekte. Iedere nieuw gemaakte of geïmporteerde TG lijn zal een proces doorlopen met verschillende mijlpalen en keuzemomenten zoals weergegeven in Figuur 1 en 2 en als hierboven beschreven.

Het mechanisme van hartontwikkeling hangt nauw samen met dat van de functie van het geleidingssysteem en ritmeregulatie. Daarom hebben de experimenten een duidelijke samenhang; de processen en functies die worden gemeten hebben een directe relaties met elkaar.

Interactie:

De gevonden effecten in de eerste fase expressiebepaling (in de tweede generatie nakomelingen; Figuur 2) hebben consequenties voor het daarna te volgen experimentele traject. In de tweede fase zullen alle lijnen onderzocht worden op structurele afwijkingen, elektrofysiologische afwijkingen en genexpressie afwijkingen. Echter, afhankelijk van de waargenomen effecten van modificatie in de eerste screening en de verwachting, zal de nadruk worden gelegd op structuur bepalingen (aangeboren hartafwijkingen) of elektrofysiologische bepalingen (ritmestoornissen). Resultaten van de experimenten in de tweede fase hebben consequenties voor de keuze om dieper te onderzoeken, in een andere richting te onderzoeken of het onderzoek af te ronden.

Mijlpalen:

- Succesvolle generatie founders en daaruit voortkomende lijnen
- Succesvol karakteriseren van de muizenlijn, en besluit tot verder onderzoek of tot terminatie.
- Succesvol vaststellen van het fenotype van heterozygote en homozygote dieren; besluit tot vervolggexperimenten.
- Achterhalen van het werkingsmechanisme van de gemodificeerde genen en elementen.

Keuzemomenten zijn:

- Founders worden geïdentificeerd, overgeschreven op dit protocol en gekruist met een wildtype muis om een lijn te genereren.
  - De lijn wordt onderzocht (heterozygote dieren van de 1e en 2e generatie) en gezondheid gemonitord voor besluit fok zonder of met risico op ongerief.
  - Op basis van de aangebrachte modificatie wordt van een set kandidaat-genen bepaald of de expressie
-

is veranderd. Als genexpressie is veranderd, wordt de lijn aangehouden, zo niet dan wordt de lijn getermineerd (Figuur 1).

- Op basis van de resultaten van de experimenten zal besloten of, en welke, vervolggexperimenten nodig zijn.
- Als het ECG een verandering laat zien als gevolg van modificatie, wordt de lijn verder elektrofysiologisch en moleculair onderzocht. Als het ECG geen verandering laat zien maar expressie van genen met een verwachte rol in functie aangedaan is zal de lijn verder onderzocht worden.
- Als een structurele afwijking wordt gevonden in het hart (of ander orgaan) zal de ontwikkeling worden onderzocht en de moleculaire mechanismen.
- Als de expressie is aangedaan van genen met een verwachte rol in regulatie van genexpressie, van groei, van ontwikkeling, zal het effect van de modificatie op regeneratie onderzocht worden.
- Een combinatie van bovenstaande effecten zal leiden tot analyse van functie, structuur, ontwikkeling en regeneratie.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	ECG, MI, Isolatie van weefsel uit neonaten en adulten
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Aangeboren hartafwijkingen, regeneratie, ritmestoornissen, genetische elementen

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Variatie in de genetische opmaak beïnvloeden in hoge mate de kans op problemen aan het hart en hoe iemand daarna herstelt. Uit de literatuur blijkt dat mutaties en variaties in het DNA die aangeboren hartafwijkingen en ritmestoornissen veroorzaken, sterk overeenkomen. Ook de ontwikkeling van hart en het herstel na een hartaanval liggen in elkaars verlengde. Zo kunnen volwassen harten niet goed herstellen na een hartinfarct, maar kinderharten kunnen dat wel. Door de precieze route van hartontwikkeling in een beschadigd hart in kaart te brengen, kan dit leiden tot een therapie om de regeneratie van het hart te verbeteren.</p> <p>Met dit onderzoek willen we de werking van de genen en regelementen die</p>
---	---

	de hartontwikkeling aansturen bestuderen en de effecten van mutaties en variaties hierin achterhalen. Deze kennis geeft inzicht in de processen van hartontwikkeling, regeneratie en prikkelgeleiding. Het onderzoek resulteert in betere bepaling van het persoonlijk risico op een hartziekte en een betere diagnose. Uiteindelijk leidt dit tot identificatie van genen waarop de behandeling zich moet richten.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
	We verwachten dat dit project ons meer leert over de rol die genetische elementen ("regelementen en genen") spelen in het ontstaan van hartafwijkingen, regeneratie na hartschade en ritmestoornissen. We verwachten nieuwe aangrijpingspunten te vinden voor het schatten van de kans op en ernst van hartafwijkingen en ritmestoornissen, en voor het ontwikkelen van individuele behandelingen om ritmestoornissen te voorkomen of verhelpen en regeneratie van het hart na schade te stimuleren.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
	Genetisch gemodificeerde muizen. 9.675 in een periode van 5 jaar
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
	De dieren met een genetische verandering hebben klein risico op ongerief. Bij de dieren wordt een ECG afgenomen, wat leidt tot matig ongerief. Twintig procent van de dieren die een hartinfarct ondergaat loopt het risico op het ontwikkelen van ernstig hartfalen. Indien dit ontwikkelt worden deze dieren vroegtijdig uit de proef genomen om erger ongerief te voorkomen. Na het ondergaan van het hartinfarct zullen de dieren (tijdelijk) individueel gehuisvest worden, voor een beter en sneller herstel na de operatie. Op langere termijn geeft individuele huisvesting stress aan de muizen, aangezien zij van nature in groepsverband leven.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
	Muizen worden zonder voorafgaande ingreep gedood om weefsels te verzamelen (mild ongerief). Bij de dieren wordt een ECG afgenomen onder anesthesie, wat leidt tot matig ongerief. Dieren die onverwacht risico op ongerief blijken te hebben als gevolg van de genetische verandering (minder dan 10 procent) worden apart gefokt, en gedood als ze daadwerkelijk ongerief hebben. In een deel van de dieren wordt een hartinfarct veroorzaakt, wat leidt tot matig ongerief in 80 procent van de dieren. 20 procent van de dieren met een hartinfarct, ondervindt kortstondig ernstig ongerief, en worden gedood..
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
	Na afloop worden alle dieren gedood.

## 4 Drie V's

4.1	<b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet
	We hebben zoveel mogelijk van het voorwerk uitgevoerd met proefdiervrije methodes, analyses van de werking van genetische elementen in celkweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. De genetische elementen zijn onderdeel van de ingewikkelde processen van hartontwikkeling en regulatie van het hartritme. Hierbij spelen meerdere celtypes, hun interacties en orgaanstructuur een belangrijke rol, waardoor

gebruikt kunnen worden.

het nodig blijft ook dierproeven te doen.

#### 4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

We voeren een statistische berekening uit waarmee we bepalen hoe we met zo min mogelijk dieren de vraagstelling op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden.

We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen. Voor die nieuwe vragen zijn dan geen nieuwe proefdieren nodig.

#### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype(n) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van het hartritme in de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. We onderzoeken hartfunctie in levende muizen en in geïsoleerde harten. Hiervoor hebben we onlangs geïnvesteerd in een nieuwe elektrische en optische meetopstelling waarmee we hele kleine verschillen in eigenschappen zoals bijv. geleidingssnelheid kunnen vinden. Hierdoor zijn minder muizen nodig om verschillen aan te tonen, wat bijdraagt aan verfijning en aan vermindering.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Als onderdeel van de verfijning van de dierproef zetten wij ervaren biotechnici in bij de handelingen aan de proefdieren. Dit vermindert voor een groot deel de stress en het lijden ten gevolge van de handelingen. Als de muizen een kans lopen op pijn door de handelingen wordt pijnbestrijding toegepast. De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze kort aan mogelijke stress blootstaan. Alle dieren in het experiment worden regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart"/> |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit type dierproef bestuderen we de rol van genen en regel-elementen in de ontwikkeling, (elektrische) functie en regeneratie van het hart. We onderzoeken genetisch gemodificeerde muizen, reeds bestaand of verkregen via "genome editing" (CRISPR-Cas9). Het betreft knock-outs, knock-ins en gecombineerde transgenen (■■■■■-induceerbare knock-outs (Cre-loxP) of gecombineerde modificaties). We onderzoeken in deze muizen de effecten van de gemodificeerde genen en regel-elementen op de 1) ontwikkelingen van hart we via isolatie van embryo's en foetussen, 2) (elektrische) functie van het hart door het meten van elektrische en optische signalen, en 3) regeneratieve response van het hart door chirurgisch induceren van een hartinfarct.

Op diverse niveaus en leeftijden wordt de ontwikkeling, functie en regeneratie van het hart bestudeerd, opgedeeld in de volgende onderdelen:

#### 1. Gezondheid monitoring en initiële analyse van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen

Nadat we founders krijgen van de ■■■■■, zullen deze 2 generaties gefokt worden terwijl de gezondheid gemonitord wordt. Om tijd en dieren te sparen worden jonge muizen (4-8 weken) van de tweede generatie gebruikt voor een initiële analyse van genexpressie in geïsoleerde weefsels om te bepalen of de modificatie in de nieuwe lijn een biologisch effect heeft. Uitkomstparameters: effecten op niveau van genexpressie.

#### 2. Elektrofysiologische karakterisatie muis

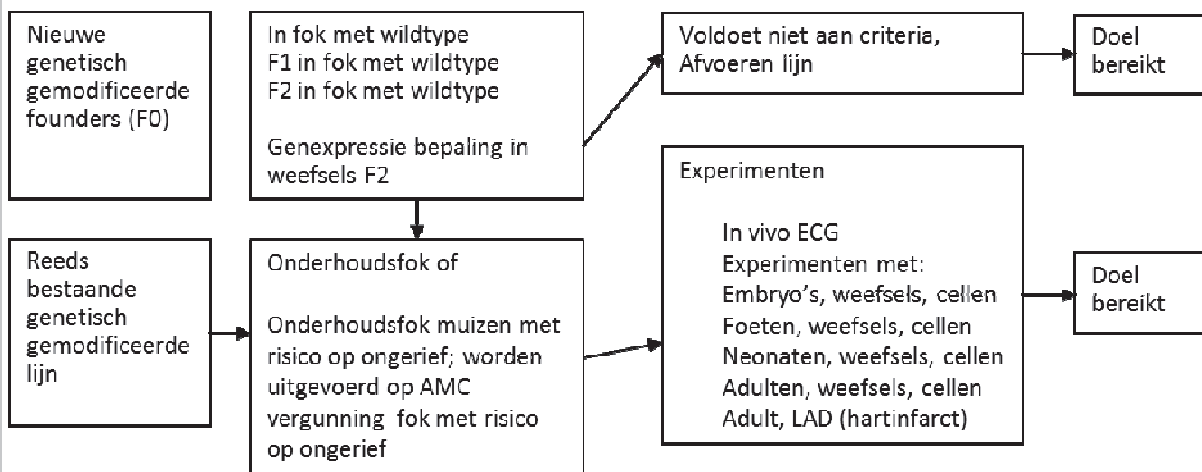
In dit experiment testen we of de genetische modificatie leidt tot elektrofysiologische veranderingen van het hart. We zullen levende transgene muizen onderzoeken onder anaesthesie met behulp van een electrocardiogram (ECG). uitkomstparameters: QRS-duur, PR-interval, hartritme en QT-tijd.

### 3. Karakterisatie ontwikkeling en functie

In dit experiment worden muizen (embryonale dag 7.5-18.5, neonaat tot en met adult) geofferd zonder voorafgaande handeling om hieruit weefsels te isoleren. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.

### 4. Regeneratie na hartinfarct

In volwassen transgene en controle dieren zal een hartinfarct (MI) worden geïnduceerd. In een deel van de dieren wordt op verschillende momenten na de inductie een stof (eiwitoplossingen zoals [REDACTED]) ingespoten die regeneratie stimuleert ([REDACTED], [REDACTED]) (veroorzaakt geen additioneel ongerief). Tevens wordt voor, tijdens en na het induceren van het infarct een ECG afgenomen onder anesthesie. Aan einde van dierproef worden weefsels geïsoleerd voor verdere analyse. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.



Alle experimenten hierboven beschreven staan in het teken van het ophelderen van de functie van geselecteerde genen en regel-elementen in de ontwikkeling, regeneratie en elektrofysiologische functie van het hart, en de bijdrage van modificaties in deze genen en regel-elementen aan aangeboren hartafwijkingen, regeneratie en ritmestoornissen.

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

#### Twee generaties fok en initiële analyse nieuwe genetisch gemodificeerde lijn.

Handeling: offeren van muis zonder voorafgaande handeling

De founder (F0) wordt gekruist met een wildtype dier. De eerste generatie nakomelingen (F1) wordt gecontroleerd op kiembaan transmissie van de modificatie. Gemodificeerde dieren worden gebruikt voor het genereren tweede generatie (F2). 5 transgene F2 muizen en 5 wildtype nestgenootjes worden geëuthanaseerd om weefsels te isoleren voor genexpressie bepaling (qPCR). 5 dieren worden aangehouden om naar de fokunit over te plaatsen om de lijn aan te houden, tenzij de genexpressie analyse uitwijst dat de modificatie geen biologisch effect heeft. In dat geval wordt de lijn getermineerd. Van alle muizen wordt de gezondheid gemonitord. Bij vaststelling risico ongerief wordt de lijn overgeplaatst op protocol fokken met ongerief risico.

#### Het meten van het ECG van levende muizen.

Handelingen: Afnames van ECGs op verschillende tijdstipmomenten.

Aanpak: De muizen worden verdoofd met 4% isofluraan in 1L/min O<sub>2</sub> waarna aan alle vier de poten een elektrode zal worden bevestigd. Gedurende vijf minuten zal een ECG worden afgeleid om PQ, QRS, RR en QT intervallen te bepalen. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na het laatste ECG wordt de muis gedood en het hart geïsoleerd en verder geanalyseerd—Het ECG geeft inzicht in de elektrische functie van het hart en is een non-invasieve methode waardoor we eenzelfde muis op

verschillende tijdstipmomenten kunnen te bemeten.

### **Weefsel isolatie uit embryo's, neonaten en volwassen dieren**

Handelingen: offeren van muis zonder voorafgaande handeling.

Aanpak: voor adulten, offeren van de muis en daarna weefsel isolatie. Het doden van dieren wordt gedaan volgens richtlijn 2010/63/EU (ongerief licht).

Voor neonaten: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt, blijft het koppel instaan en uit dit koppel worden pups geboren. Deze worden op verschillende dagen na de geboorte (neonatale stadia) geanalyseerd. Op de dag van isolatie zullen de pups van de moeder worden weggenomen. Offeren van pups en daarna weefsel isolatie.

Kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt.

Handeling adulten: ████████ injecties; offeren

Aanpak: Muizen worden voor inductie van de genexpressie behandeld met ████████ voor max 4 dagen. Intraperitoneale toediening (ongerief licht) of oraal toedienen dmv een gavage naald (ongerief licht) of intragastraal toedienen dmv injectienaald (ongerief licht). Volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn ████████.

### **Embryo/foeten isolatie**

Handelingen: muis drachtig laten worden; echo; ████████ injecties; offeren

Aanpak: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt het koppel uit elkaar gehaald. De plug wordt gezien als embryonaal stadium (E)0.5. Er zullen embryo's en foeten geïsoleerd worden vanaf E7.5 tot en met E18.5. Als er vroege stadia embryo's worden geïsoleerd (tot en met E10.5), zal er eerst een echo gemaakt worden om te kijken of de muis daadwerkelijk drachtig is. Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn. Vanaf E11.5 is het voor de diervverzorgers met het oog zichtbaar of het vrouwtje drachtig is of niet. In het geval van een kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt, zal ████████ worden toegediend aan de moeder. Na het offeren van de drachtige muis wordt de uterus verwijderd en in ijskoude PBS gedaan. In deze ijskoude PBS worden de embryo's geïsoleerd. Deze zullen worden gefixeerd in 4% PFA of bevroren worden in vloeibare stikstof. Embryo's ouder dan E12.5 worden eerst gedecapiteerd en de borstkas wordt geopend zodat de formaldehyde beter doordringt tot hart en andere organen.

### **Inductie hartinfarct**

Handeling: bloedafnames; ████████ injecties; kransslagaderligatie

Onder algehele anaesthesie en adequate analgesie zal bij de muizen een permanente ligatie van de linker kransslagader worden aangebracht (ongerief matig). De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen voor/tijdens en na de operatie pijnstilling krijgen. Voorafgaand aan de operatie wordt bloed afgenomen voor biochemische/immunologische bepalingen, volgens richtlijn <https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling> (ongerief licht). Na de operatie worden de muizen individueel gehuisvest om goed te kunnen herstellen. De dieren zullen na de operatie voor een bepaalde periode gevolgd worden. In subgroepen dieren wordt meermaals een stof ingespoten, zoals opgeloste eiwitten ████████, die een invloed heeft op regeneratie-gerelateerde processen (volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn ████████, ongerief gering). Na deze periode zal van de dieren een ECG worden afgeleid onder anesthesie waarna het dier wordt geofferd voor weefselisolatie.

---

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

Power berekeningen, met een power van 0.8 en een alpha van 0,05, worden gebruikt om het minimum aantal benodigde dieren te berekenen dat nodig is om een bestaand verschil statistisch significant waar te nemen, zoals beschreven in de artikelen van Lenth: [http://conium.org/~maccoun/PP279\\_Lenth.pdf](http://conium.org/~maccoun/PP279_Lenth.pdf) en Charan en Kantharia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826013/>). Om een verschil tussen de gemiddelden van de twee groepen te meten, is het nodig te weten hoe groot dat verschil is ten opzichte van de standaard deviatie in ieder van de groepen. Voor een relatief verschil (experimenteel ten opzichte van controle) is een schatting van de standaard deviatie van deze ratio nodig. Aangezien we op dit moment geen experimentele data hebben mbt de individuele genen, nemen we voor de schatting de grootste bron van variatie, de biologische variatie, waarvan we uit eerdere experimenten weten dat die tussen de 20 en

30% (CV=0.2 -0.3) ligt. Aangezien de biologische variatie voor zowel de controle als de experimentele groep geldt, kan hieruit met doorwerking van fouten de standaard deviatie van de ratio worden berekend (SD-ratio). In onderstaande tabel staat voor een aantal mogelijke relatieve verschillen en een reeks van CVs het minimaal aantal dieren per groep dat nodig is om het verschil aan te tonen als het werkelijk aanwezig is.

alpha	0.05				
power	0.8				
	CV (Biologische variatie)				
	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4
	SD-Ratio				
Rel Verschil	0.14	0.28	0.35	0.42	0.57
1.25	5.0	20.1	31.4	45.2	80.4
1.50	1.3	5.0	7.8	11.3	20.1
2.00	0.3	1.3	2.0	2.8	5.0
2.50	0.1	0.6	0.9	1.3	2.2
3.00	0.1	0.3	0.5	0.7	1.3
5.00	0.0	0.1	0.1	0.2	0.3

Wanneer er experimentele waardes uit pilotexperimenten bekend zijn, zal er met de gegevens powerberekening wordt uitgevoerd met software voor groeps-grootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower). De aantallen uit tabel die in rood zijn aangegeven vinden wij niet acceptabel. Eerder gepubliceerde onderzoeken van onze groep laten zien dat een groeps-grootte tussen 5 en 10 dieren vaak voldoende blijkt om functioneel relevante verschillen aan te tonen.

## B. De dieren

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

**Diersoorten:** Muizen, zowel wildtype en genetische veranderde dieren. Als controles worden, daar waar mogelijk, wildtype nakomelingen gebruikt. Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat de groep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit goede en geaccepteerde modellen zijn voor de beschreven ziektes.

**Herkomst:** In dit experiment worden muizen gebruikt, welke voortkomen uit eigen fok of zelf gecreëerd zijn met behulp van CRISPR/Cas9 techniek, of worden verkregen van een commerciële afleveringsbedrijf of van een andere onderzoeksgroep.

**Levensstadia:** Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. De leeftijden lopen van embryonaal tot adult. Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen door elkaar heen worden gebruikt.

**Geschatte aantallen:** De geschatte aantallen per proef zoals hierboven berekend zijn gebaseerd op statistische berekeningen, rekening houdend met uitval, gebaseerd op eigen ervaring of ervaring van naaste collega's, en rekening houdend met de hoeveelheden cellen/weefsel die nodig zijn voor de beschreven analyses. Het aantal proeven is gebaseerd op ervaring van de onderzoeksgroep, rekening houdend met de grootte van de onderzoeksgroep en verwachte aantallen experimenten die we willen en kunnen uitvoeren. Voor bovenstaande experimenten worden daarom de volgende maximale hoeveelheden dieren aangevraagd:

1. Elektrofysiologische karakterisatie muis: Van 20 dieren per lijn ECGs afnemen; 50 lijnen in 5 jaar: 20 x 50 = 1000 ECGs. Deze muizen zullen na het meten van de laatste ECG geofferd worden, waarbij zij dan vallen onder punt 3. Onder dit punt worden dus geen muizen geofferd.
2. Twee generaties fok nieuwe genetisch gemodificeerde lijn: 1 founder, 20 F1 muizen en 30 F2 muizen per lijn. 50 nieuwe lijnen in 5 jaar = max. **2550** muizen.
3. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie volwassen hart: Verwachting: 40 lijnen per 5 jaar (niet alle lijnen uit punt 2 worden volledig onderzocht). Per lijn 30 adulte muizen (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 15 heterozygoten, 15 homozygoten; diverse analyses) = 40 x 35 = **1400**.
4. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie neonatale hart. Per lijn 75 neonaten (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 10 heterozygoten, 10 homozygoten; 3 stadia, diverse analyses). 15

lijnen in 5 jaar: **1125**.

5. Karakterisatie van de prenatale ontwikkeling en functie: Per lijn 24 drachtige muizen, waarvan 40% E14.5 en ouder zal zijn. Gemiddeld aantal embryo's/voeten per nest: 10; 25 lijnen in 5 jaar: 14 moeders+10 moeders +(10 x 10 voeten) x 25 = **3100** muizen.

6. Regeneratie na hartinfarct: maximaal 5 lijnen per jaar. Hierbij wordt in 3 groepen per lijn (wildtypes, enkel transgen/heterozygoot en gecombineerde allelen / homozygoten) een hartinfarct geïnduceerd. Voor een volledige analyse zijn maximaal 60 muizen per lijn nodig = 300 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = **1500** muizen.

De som van de dikgedrukte getallen geeft een totaal van maximaal 9.675 dieren voor de periode van 5 jaar. Deze aantallen zullen alleen gehaald worden als voor elke lijn het maximale aantal analyses wordt uitgevoerd.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### Vervanging:

We zullen zoveel mogelijk van het voorwerk uitvoeren met proefdier vrije methodes; te weten analyses van de werking van genetische elementen in celweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. In vivo werken de genetische elementen in de context van het uiterst complexe proces van hartontwikkeling en ritmeregulatie. Bij deze processen spelen verschillende celtypes een rol, waarbij hun interacties en de veranderende orgaanstructuur een belangrijke rol spelen. Als gevolg van deze complexiteit is het niet mogelijk dit proces volledig in vitro na te bootsen. Om de normale en/of afwijkende ontwikkeling en functie van het hart te kunnen onderzoeken is een dierproef noodzakelijk. We achten daarom deze dierexperimenten essentieel voor het bereiken van het onderzoeksdoel.

#### Vermindering:

We voeren een statistische berekening uit waarmee we kunnen inschatten hoe we met zo min mogelijk dieren, toch de vraag op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden. Tevens worden genetische elementen voorafgaand aan een dierproef uitgebreid bioinformatisch, in patiënt materiaal en in in vitro kweeksystemen geanalyseerd.

Door tegelijkertijd met de gezondheidsmonitoring een eerste validatie van de muizenlijn op genexpressie niveaus uit te voeren, kan al in een vroeg stadium bepaald worden of de genetische verandering in de muizenlijn een voldoende groot effect heeft voor het beoogde onderzoek. Mocht dit niet het geval zijn, dan wordt de lijn getermineerd en zullen er dus geen verdere experimenten met deze lijn worden uitgevoerd. Deze stap zorgt voor een vermindering van het aantal proefdieren, maar ook van het aantal muizenlijnen dat in onderhoudsfok staat. Op grond van deze eerste genexpressie analyse zal per lijn bepaald worden welke van de experimenten de beste informatie zullen opleveren over het effect van de modificatie. Met andere woorden, niet alle in deze aanvraag beschreven experimenten zullen op alle te genereren muizenlijnen worden uitgevoerd.

Door zowel mannen als vrouwen te gebruiken voor deze experimenten worden er minder dieren uit voorraad gedood dan bij het gebruik van slechts een geslacht.

We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen, zonder dat hier een nieuwe dierproef voor hoeft te worden ingezet. Meerdere ECGs kunnen worden uitgevoerd op hetzelfde dier om de technische variatie te verkleinen en eventuele tijdsgebonden processen te volgen.

#### *Verfijning:*

Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van ritme in de mens ( ). We nemen ECGs af van muizen omdat het ECG de voorkeursmethode in de kliniek is om elektrische hartfunctie van patiënten te meten. Dit maakt het mogelijk om de bevinding in de muis te transleren naar de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. Daarnaast worden de analysemethoden zoveel mogelijk verfijnd en hebben we geïnvesteerd in nieuwe ECG apparatuur waarmee we hoogwaardige ECGs kunnen afnemen.

De verdere karakterisering van hartfunctie wordt ex vivo uitgevoerd met behulp van een Langendorff-perfusie-opstelling. Met deze methode is het mogelijk een zeer hoge resolutie in tijd en ruimte te bereiken waardoor kleine maar significante verschillen met een minimaal aantal muizen kunnen worden aangetoond. Deze meeting en interventies zullen door ervaren analisten worden uitgevoerd, zodat technische mislukkingen tot een minimum worden beperkt.

Wanneer er embryo's of foeten moeten worden geïsoleerd, zal het vrouwtje alleen worden geofferd wanneer zij uiterlijk kenmerken van drachtigheid vertoont. Wanneer wel een zwangerschap wordt verwacht en er geen of onvoldoende uiterlijke kenmerken zijn, dan zal met een echo bepaald worden of het vrouwtje daadwerkelijk drachtig is. Bij weghalen bij moeder van pups tot speenleeftijd (21 dagen) er altijd zorg voor worden gedragen dat er 2 pups bij de moeder achterblijven om stuning van de moedermelk en borstontsteking te voorkomen.

De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk weer teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze steeds maar kort aan de mogelijke stress door de handelingen blootstaan. Alle dieren in experiment worden heel regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. Tijdens en na de MI operatie wordt pijnstilling gegeven.

---

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

Door de dieren voor het euthanaseren door middel van cervicale dislocatie te bedwelmen met CO<sub>2</sub>, wordt pijn en angst voor de dieren tot een minimum beperkt.

In een klein deel van de muizen wordt ( ) stof toegediend. Het toedienen wordt gedaan door biotechnici die veel ervaring hebben om het ongerief tot een minimum beperkt.

Bij muizen met een hartinfarct zal goede monitoring helpen voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niveau wordt overschreden en indien de humane eindpunten worden bereikt worden de dieren geëuthanaseerd. Pijnstilling wordt systemisch en lokaal gegeven tijdens en na operaties.

Alle dieren worden op D1 niveau gehuisvest.

---

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

NVT.

---

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de

---

dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Na de hartinfarct (MI) operatie zullen de muizen individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat kooigenoten de hechtingen openknagen wat tot ernstig ongerief leidt. Tevens hebben we in het verleden waargenomen dat wanneer een kooigenoten meer ongerief ondervinden dan een van de andere kooigenoten, de kooigenoot met het minste ongerief dominant gedrag vertoont, wat het ongerief van de andere kooigenoten versterkt. Dit gedrag is sterker bij mannen dan bij vrouwen. De mannelijke muizen worden maximaal 1 maand individueel gehuisvest, aangezien het samen huisvesten van mannelijke muizen na separatie niet mogelijk is zonder kans op vechten. De vrouwelijke muizen worden maximaal 1 week individueel gehuisvest, zodat de wond optimaal kan genezen. Hierna worden zij weer in groepsverband gehuisvest.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Om pijn bij embryo's en foeten te voorkomen wordt de uterus met de embryo's/foeten overgebracht naar ijskoude fysiologische zout oplossing. Door de hypothermie zullen de embryo's overlijden en de foeten verdoofd raken. De foeten worden vervolgens gedood door decapitatie.

Wanneer een ECG afgeleid wordt zal het dier verdoofd worden met isofluraan omdat de dieren stil moeten liggen om een betrouwbaar ECG af te kunnen leiden. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na de afname van het laatste ECG wordt het dier gedood voordat het bijkomt uit de narcose, en worden de organen geïsoleerd voor analyse. Door deze handelingen te combineren wordt het ongerief beperkt.

Na de kransslagader ligaties voor de hartinfarct experimenten kunnen de muizen pijn ondervinden. De operaties gebeuren onder algehele verdoving en de muizen worden voor/tijdens en na de operatie behandeld met pijnstilling. De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen na de operatie pijnstilling ontvangen. De dieren zullen tijdens de operatie op een warmtemat worden geplaatst. Daarnaast krijgen de dieren minimaal 3 dagen na de operatie hoogenergetisch natgemaakt voer. De dieren worden minimaal 1 week dagelijks gemonitord, en zodra de situatie het toelaat twee keer per week gemonitord.



## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Echo om jonge zwangerschap vast te stellen: Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn (ongerief: licht).

Toediening [REDACTED].

Fok met risico op ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij injectie t [REDACTED]: irritatie van plaats van injectie.

Bij fok met ongerief: het eventuele ongerief als gevolg van de genetische modificatie zal zich waarschijnlijk uiten in hartfalen.

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

De toedieningen worden uitgevoerd door ervaren biotechnici.

Als het risico op ongerief groot is (meer dan een kwart van de dieren heeft ernstig ongerief) zal de lijn getermineerd worden.

## J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Algemeen: Bij het bereiken van humane eindpunten, zoals het ontwikkelen van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, afwezige voedselinname, of diarree – over een periode van 2-3 dagen, het aantreffen van wonden, of meer dan 10% gewichtsverlies in een week.

Hartinfarct operatie: Tijdens operatie: veel bloedverlies. De eerste week postoperatief: ernstige infectie van de wond, 15% gewichtsverlies ten opzichte van gewicht voor operatie. Uitingen van acuut hartfalen: verminderde activiteit, slecht poetsen, extreme kortademigheid, opgebolde rug, als er de dieren weer op uitgangsgewicht gekomen zijn, 8% gewichtsverlies in 1 dag of meer dan 10% in 2 dagen.

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

Minder dan 1% voor alle niet invasieve experimenten en voor de muizen die een hartinfarct ondergaan verwachten we dat dit 20% is ([REDACTED]).

## K. Classificatie van ongerief

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

De voor de meeste muizen die op dit protocol worden gebruikt, wordt het ongerief geclassificeerd als licht omdat er bij deze muizen geen handeling worden uitgevoerd voor het doden (max. 8175 muizen).

Wanneer er tijdens het leven van een muis een ECG afgenomen wordt, dan wordt het ongerief geclassificeerd als matig als gevolg van het bijkomen uit de narcose (max. 1000 muizen).

Voor een muis waaraan [REDACTED] wordt toegediend, wordt het ongerief geclassificeerd als licht (afhankelijk van gebruik aantal conditionele lijnen (max 1000 muizen) + 500 muizen na infarct).

Voor muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1200), wat bij het ontwikkelen van hartfalen in 20% van de geopereerde muizen kortstondig matig kan zijn (max. 300).



## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Er dienen organen geïsoleerd te worden voor verdere analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.*

*Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project            **Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart**
3. Titel van de NTS                 **Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval**
4. Type aanvraag:
  - X nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC                            **DEC-AMC**
  - telefoonnummer contactpersoon   **[REDACTED]**
  - e-mailadres contactpersoon       **[REDACTED]**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):  
 ontvangen door DEC  
 aanvraag compleet  
 in vergadering besproken            **27 juli 2017**  
 anderszins behandeld  
 termijnonderbreking(en) van / tot  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met  
 maximaal 15 werkdagen  
 aanpassing aanvraag  
 advies aan CCD
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

*De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.*

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.*

8. Eventueel horen van aanvrager nvt
- Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager nvt
- Datum
  - Gestelde vraag/vragen
  - Datum antwoord
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*  
>ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~een wijziging op een bestaande vergunning.~~
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?  
>ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.  
>nee

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling [het identificeren van genetische elementen (regulatorische elementen en genen) die nodig zijn voor de ontwikkeling en voor de elektrische functie van het hart, het achterhalen van het onderliggende mechanisme van hun functie, en het onderzoeken van hun functie in het herstel (regeneratieve respons) na een hart infarct].

De aanvragers richten zich op 5 verschillende gebieden:

1. de functie van het geleidingssysteem.

2. de functie van het atrium en boezemfibrillatie.
3. gevoeligheid voor ritmestoornissen van de kamers, met name de rechterkamer uitstroom, waar bij de mens veel ritmestoornissen ontstaan.
4. het ontstaan van aangeboren hartafwijkingen.
5. Regeneratie na hartschade.

De subdoelen zijn niet tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van onderzoeksgroep met het bestuderen van genetische elementen in hartziekten. De personele bezetting en de financiële situatie voorzien verder in de behoeftes aangaande het voorgestelde onderzoek.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

>nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van genetische elementen in afwijkingen in het functioneren van het hart.

#### *Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel (het verkrijgen van inzicht in de rol van genetische elementen in het functioneren van het hart) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het vinden van mechanismen en genen die door menselijk handelen kunnen worden beïnvloed ("druggable") en zo kunnen leiden tot verbeterde behandelingen. Ondanks dat de toepassing van deze kennis in een behandelmethode in de toekomst ligt, acht de DEC het onderzoek naar deze strategie noodzakelijk en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project, zijn de proefdieren, de onderzoekers en in mindere mate patiënten met (aangeboren of verkregen) hart- en vaatziekten. Een deel van de muizen wordt door dit onderzoek geschaad omdat ze pijn en stress ondergaan door een operatie, het individueel huisvesten tijdens de herstelperiode of het ondergaan van een ECG meting onder verdoving. Het grootste gedeelte wordt gedood zonder voorafgaande behandeling. De onderzoekers zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièrekansen vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op hun nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op lange termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling van aangeboren en verkregen hartziekten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Er is geen aanleiding om te twifelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid. De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met de beschreven technieken.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project. Na een genetische modificatie zal de fok voor twee generaties gevolgd worden op het ontwikkelen van ongerief. In een volwassen muis zal een ECG gemaakt worden om veranderingen in de elektrofysiologie te onderzoeken. In embryo's, neonaten en volwassen dieren worden structurele, functionele of moleculaire veranderingen in weefsels en organen bepaald. In volwassen dieren zal een hartinfarct geïnduceerd worden door middel van een operatie om de regeneratie te bestuderen. In dit experiment wordt het effect van toediening van herstel stimulerende stoffen bestudeerd. De DEC is van mening dat deze onderzoeksstrategie kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)

- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

Er wordt voldaan aan bijlage III. Dieren die een hartinfarct operatie ondergaan worden individueel gehuisvest om het openknagen van hechtingen door kooigenoten te voorkomen. Bij vrouwelijke dieren duurt dit herstel een week. Mannelijke dieren worden na het herstel niet meer sociaal gehuisvest omdat er een te groot risico op vechten is. Voor de mannelijke dieren duurt de individuele huisvesting (maximaal) een maand.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. Het cumulatieve ongerief is ingeschat op licht voor muizen die zonder voorafgaande behandeling gedood zullen worden en maximaal matig voor muizen die herhaald een ECG (onder verdoving) en/of een hartinfarct operatie zullen ondergaan. Dieren die acuut hartfalen ontwikkelen (wat ernstig ongerief veroorzaakt) na het induceren van het hartinfarct zullen na constatering van symptomen die hierop wijzen, direct uit de proef genomen worden. De inschatting van matig ongerief is daarom voor deze groep dieren juist ingeschat.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De "heelheid" van het dier wordt aangetast doordat er genetische modificaties plaatsvinden. Er wordt niet verwacht dat hierdoor sprake zal zijn van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Na het induceren van het hartinfarct kan het dier wel stress en pijn ondervinden waardoor het natuurlijk gedrag verstoord wordt.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De criteria voor een humaan eindpunt zijn goed gedefinieerd om onverwacht ongerief te voorkomen. Dieren die tekenen vertonen van algemeen onwelzijn of geen exploratief gedrag meer hebben, zullen vroegtijdig uit de proef genomen worden. Voor de dieren die een hartinfarct operatie ondergaan worden deze gedefinieerd als veel bloedverlies tijdens de operatie en na de operatie: infectie van de wond, >15% gewichtsverlies en uitingen van acuut hartfalen. Het percentage dat in de groep met niet-invasieve experimenten een HEP zal bereiken wordt geschat op <1% en voor de overige muizen <20%. De DEC beoordeelt deze inschatting realistisch, gezien de ervaring van de aanvrager met dit type onderzoek.

### 3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager geeft aan dat het onderzoeken van genetische elementen in de ontwikkeling van het hart en de regulatie van het ritme niet in een proefdierdier vrij alternatief bestudeerd kan worden omdat het een zeer complexe interactie van verschillende celtypes betreft. De aanvragers geven aan zoveel mogelijk voorwerk met proefdierdier vrije methodes te verrichten, zoals de werking van genetische elementen in specifieke celtypes, genetische analyse van patiëntmateriaal, en bioinformatische analyses om de functie van de genetische elementen in te schatten. Gezien de vraagstellingen van dit onderzoek vindt de DEC dat de aanvrager voldoende heeft onderbouwd dat voor dit onderzoek geen proefdierdier vrij alternatief voor handen is.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van statistische methoden en met waarden uit eerdere proeven. Er is een voorlopige power berekening gedaan om de aantallen te schatten voor de verschillende uitkomstparameters. De ECGs en de karakterisatie van het hart worden in dezelfde dieren verricht. Naast de vermindering van proefdieren, is er ook sprake van verfijning (in de zin van de meest geschikte methode) omdat uitkomstparameters geanalyseerd kunnen worden op associaties.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:

- 1) de muis een goed model is voor de vorming van het hart en de regulatie van het ritme in de mens en de onderzoeksgroep geavanceerde apparatuur tot zijn beschikking heeft om de ECG zo goed mogelijk te kunnen verrichten;
- 2) de rattenmoeders alleen gedood worden voor de isolatie van embryo's of foeten na controle (echo) op drachtigheid en niet alleen op basis van een aanname van drachtigheid;
- 3) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven zo optimaal uit te voeren.
- 4) er gebruik gemaakt wordt van pijnstilling tijdens en na de operatie. Daarnaast borgen de HEPs (symptomen van onwelzijn of ontwikkelen van acuut hartfalen) dat de dieren beschermd zullen worden tegen het ondergaan van onverwacht of ernstiger ongerief dan ingeschat is in deze aanvraag.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.  
nvt

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I voor voorbeeld*).

Er wordt in dit onderzoek in gelijke mate gebruik gemaakt van mannelijke en vrouwelijke dieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De dieren worden in het kader van het onderzoek gedood voor verdere analyse van het hart.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

nvt

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Ja, de NTS is een evenwichtige weergave van het project.

## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*). *Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol die genetische elementen spelen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart, het gebruik van maximaal 9675 muizen en het lichte tot matige ongerief dat deze muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 3.B*; zie *bijlage I voor voorbeelden*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op het onderzoeken van de rol van genetische elementen op de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met een aangeboren of verkregen hartaandoening. Deze kennis zou op langere termijn kunnen bijdragen aan



een betere diagnose van en/of een betere therapie voor deze hartaandoeningen.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood zullen worden in het kader van het onderzoek of doordat ze een ECG of een hartinfarct operatie zullen ondergaan. Dit kan stress en/of pijn veroorzaken in de proefdieren.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrière mogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op hun nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op lange termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling van hartaandoeningen en een verbetering in de diagnose. Dit valt echter (ver) buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel maximaal 9675 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan de meeste zonder voorafgaande behandeling gedood zullen worden (n=7175), een gedeelte van de muizen matig ongerief zullen ondergaan doordat ze een hartinfarct operatie (n=1500) of een ECG (n=1000) zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de rol van genetische elementen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart en in de onderliggende mechanismen. De verwachting is dat de inzichten uit dit onderzoek bij kunnen dragen aan een betere diagnose of behandeling van hartaandoeningen. De toepassing van deze inzichten in de kliniek zal echter nog jaren op zich laten wachten en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over de rol van genetische elementen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het licht tot matige ongerief en het gebruik van maximaal 9675 muizen opweegt.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

### **Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval**

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de rol die genetische elementen spelen in de ontwikkeling, regeneratie (na een hartaanval) en de functie van het hart, het gebruik van maximaal 9675 muizen en het lichte (n=7175) tot matige ongerief (n=1500 hartinfarct en n=1000 voor herhaalde ECG analyses) dat ze zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. Het grootste

gedeelte van de muizen zullen gedood worden zonder voorafgaande behandeling (naast het genetisch manipuleren). Een gedeelte van de muizen (maximaal 1500) zullen een hartinfarct operatie ondergaan. Analyses met betrekking tot de elektrofysiologie, functionele/structurele/moleculaire karakterisatie, prenatale ontwikkeling en de regeneratie na hartinfarct zullen gebruikt worden om deze doelstellingen te behalen. De aanvrager heeft goed onderbouwd dat er geen proefdiervrij alternatief is voor het beantwoorden van de gestelde vraagstellingen. Het onderzoeken van genetische elementen in de ontwikkeling van het hart en de regulatie van het ritme kunnen niet in een proefdiervrij alternatief bestudeerd worden omdat het een zeer complexe interactie van verschillende celtypes betreft. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar. Het Go/No Go moment betreft vooral de selectie van de genetisch gemodificeerde lijn om de verschillende analyses in te verrichten. De lijn moet de juiste genexpressie hebben. Afhankelijk van het verwachte effect van het gemodificeerde gen wordt daarbij de passende analyse verricht. De genetisch gemodificeerde muizen waarin een ECG verricht wordt zullen ook gebruikt worden voor een functionele/structurele/moleculaire karakterisatie. Dit geeft de mogelijkheid om de associatie tussen verschillende uitkomstparameters te onderzoeken en draagt bij aan zowel verfijning van de strategie als vermindering van proefdieren. De DEC heeft in de afweging meegenomen dat naast de 9675 proefdieren in deze aanvraag, deze onderzoeksstrategie waarbij genetisch gemanipuleerde muizenlijnen gegenereerd zullen worden, een aanzienlijk aantal surplus muizen zal opleveren (muizen met een ongeschikte genexpressie). Deze dieren worden niet als proefdier gerekend maar zijn wel meegewogen in het beantwoorden van de centrale morele vraag.

De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat de operatie om het hartinfarct te induceren geoptimaliseerd is en met pijnstilling uitgevoerd zullen worden. Daarnaast zijn de HEPs duidelijk geformuleerd die de dieren beschermen tegen het ontwikkelen van onverwacht of ernstiger ongerief dan vooraf ingeschat is.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door groepsgrootte berekeningen te verrichten met data verkregen uit eerdere experimenten. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing

vereist

- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
  - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
    - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
    - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
    - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

## **Bijlage I: Voorbeelden**

*De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.*

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

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

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal

worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.  
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.  
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden.”

- C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: “Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt.”

Voorbeeld B: “Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten....., een acceptabel alternatief is, omdat.....”

- C12.Voorbeeld: “De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen.”

- C18.Voorbeeld: “De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

## **D. Ethische afweging**

- D2. Voorbeeld A: “Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.  
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.  
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel  
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep

mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft.”

Voorbeeld B: “Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel

De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan.”

- D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): “De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.”

## **E. Advies**

- E2. Voorbeeld: “Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn.....”



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31  
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1180020172348

**Bijlagen**

2

Datum 25 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020172348. 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).

**Datum:**

25 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1180020172348

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



**Datum:**  
25 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1180020172348

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800  
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 343362777  
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31  
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM  
IBAN: NL68RABO0136166741  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
25 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1180020172348

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: 0 [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 januari 2018  
Geplande einddatum: 31 december 2022  
Titel project: Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart  
Titel niet-technische samenvatting: Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval  
Naam DEC: DEC AMC  
Postadres DEC: Meibergdreef 31  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**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: Amsterdam  
Datum: 25 augustus 2017

**Datum:**  
25 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1180020172348



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie  
Postbus 400  
1115 ZJ DUIVENDRECHT  


**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  
AVD1180020172348  
**Bijlagen**  
2

Datum 25 augustus 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 25 augustus 2017  
Vervaldatum: 24 september 2017  
Factuurnummer: 172348  
Ordernummer: Kostenplaatsnummer 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1180020172348	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31  
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1180020172348

Datum 12 september 2017  
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

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

### **Onduidelijkheden**

Kunt u zowel in de NTS als in de Bijlage Dierproeven het ongerief van de dieren helderder weergeven? Voor de NTS betreft dit de handelingen aan de dieren en de ongeriefsinschatting (3.4 en 3.5). Voor de Bijlage Dierproeven betreft dit het antwoord van 2K.

Kunt u daarnaast in de NTS aangeven dat de dieren gedood worden in plaats van 'uit de proef genomen'?

### **Leges**

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

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

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

**Datum:**

12 september 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1180020172348

**Wanneer een beslissing**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



## Melding bijlagen

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

### 1 Uw Gegevens

Naam instelling: Academisch Medisch Centrum

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD1180020172348

### 2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

**Datum:**

12 september 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1180020172348

**3 Ondertekening**

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:  
Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag





Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart

**NTS:**

*Punt 3.4:*

De volgende tekst is toegevoegd:

“De dieren met een genetische verandering hebben een klein risico op ongerief. Aangezien de humane eindpunten in acht worden genomen zal in het incidentele geval het ongerief maximaal matig zijn”

“Een deel van de dieren zal intra peritoneale injectie krijgen, dit geeft licht ongerief.”

“Voor de dieren die een hartinfarct krijgen is het ongerief matig.”

Aan het punt ontwikkeling van hartfalen is het volgende toegevoegd: “Hierbij worden de humane eindpunten in acht genomen, waardoor het ongerief geclassificeerd wordt als matig.”

Daarnaast is “vroegtijdig uit proef genomen” veranderd in “vroegtijdig gedood”.

Aan het punt van individueel huisvesten is het volgende toegevoegd: “Dit geeft matig ongerief.”

*Punt 3.5:*

Aan het punt doden zonder voorafgaande ingreep is toegevoegd: “, wat leidt tot licht ongerief.”

Aan het punt ongerief door genetische verandering is toegevoegd: “Verwacht wordt dat het ongerief hierbij maximaal matig zal zijn.”

Het punt betreffende hartinfarct is aangepast tot de volgende tekst: “In een deel van de dieren wordt een hartinfarct veroorzaakt, wat leidt tot matig ongerief. In 20 procent van de dieren met een hartinfarct, kan ernstig hartfalen ontstaan. Bij constatering van het ontwikkelen van hartfalen zullen de humane eindpunten in acht worden genomen en worden deze dieren gedood waardoor het ongerief maximaal matig zal zijn.”

**BIJLAGE:**

*Punt 2K:*

Het punt betreffende hartinfarct is aangepast tot de volgende tekst:

“De muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1200).

20% van de geopereerde muizen (max. 300) kunnen hartfalen ontwikkelen. Dit valt onder de humane eindpunten en deze muizen zullen bij constatering direct gedood worden. Door het uitvoeren van de humane eindpunten blijft het ongerief als matig geclassificeerd.”



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Aangeboren hartafwijkingen, regeneratie, ritmestoornissen, genetische elementen

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Variatie in de genetische opmaak beïnvloeden in hoge mate de kans op problemen aan het hart en hoe iemand daarna herstelt. Uit de literatuur blijkt dat mutaties en variaties in het DNA die aangeboren hartafwijkingen en ritmestoornissen veroorzaken, sterk overeenkomen. Ook de ontwikkeling van hart en het herstel na een hartaanval liggen in elkaars verlengde. Zo kunnen volwassen harten niet goed herstellen na een hartinfarct, maar kinderharten kunnen dat wel. Door de precieze route van hartontwikkeling in een beschadigd hart in kaart te brengen, kan dit leiden tot een therapie om de regeneratie van het hart te verbeteren.</p> <p>Met dit onderzoek willen we de werking van de genen en regelementen die de hartontwikkeling aansturen bestuderen en de effecten van mutaties en variaties hierin achterhalen. Deze kennis geeft inzicht in de processen van hartontwikkeling, regeneratie en prikkelgeleiding. Het onderzoek resulteert in</p>
---	--

betere bepaling van het persoonlijk risico op een hartziekte en een betere diagnose. Uiteindelijk leidt dit tot identificatie van genen waarop de behandeling zich moet richten.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

We verwachten dat dit project ons meer leert over de rol die genetische elementen ("regelementen en genen") spelen in het ontstaan van hartafwijkingen, regeneratie na hartschade en ritmestoornissen. We verwachten nieuwe aangrijpingspunten te vinden voor het schatten van de kans op en ernst van hartafwijkingen en ritmestoornissen, en voor het ontwikkelen van individuele behandelingen om ritmestoornissen te voorkomen of verhelpen en regeneratie van het hart na schade te stimuleren.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Genetisch gemodificeerde muizen. 9.675 in een periode van 5 jaar

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De dieren met een genetische verandering hebben een klein risico op ongerief. Aangezien de humane eindpunten in acht worden genomen zal in het incidentele geval het ongerief maximaal matig zijn. Bij de dieren wordt een ECG afgenomen, wat leidt tot matig ongerief. Een deel van de dieren zal intra-peritoneale injectie krijgen, dit geeft licht ongerief. Voor de dieren die een hartinfarct krijgen is het ongerief matig. Twintig procent van de dieren die een hartinfarct ondergaat loopt het risico op het ontwikkelen van ernstig hartfalen. Indien dit ontwikkelt worden deze dieren **vroegtijdig gedood** -om erger ongerief te voorkomen. Hierbij worden de humane eindpunten in acht genomen, waardoor het ongerief geclassificeerd wordt als matig. Na het ondergaan van het hartinfarct zullen de dieren (tijdelijk) individueel gehuisvest worden, voor een beter en sneller herstel na de operatie. Op langere termijn geeft individuele huisvesting stress aan de muizen, aangezien zij van nature in groepsverband leven. Dit geeft matig ongerief.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Muizen worden zonder voorafgaande ingreep gedood om weefsels te verzamelen, wat leidt tot licht- (ongerief). Bij de dieren wordt een ECG afgenomen onder anesthesie, wat leidt tot matig ongerief. Dieren die onverwacht risico op ongerief blijken te hebben als gevolg van de genetische verandering (minder dan 10 procent) worden apart gefokt, en gedood als ze daadwerkelijk ongerief hebben. Verwacht wordt dat het ongerief hierbij maximaal matig zal zijn. In een deel van de dieren wordt een hartinfarct veroorzaakt, wat leidt tot matig ongerief. In 20 procent van de dieren met een hartinfarct, kan hartfalen ontstaan. -Bij constatering van het ontwikkelen van hartfalen zullen de humane eindpunten in acht worden genomen en worden deze gedood, waardoor het ongerief maximaal matig zal zijn.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na afloop worden alle dieren gedood.

## 4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- We hebben zoveel mogelijk van het voorwerk uitgevoerd met proefdiervrije methodes, analyses van de werking van genetische elementen in celweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. De genetische elementen zijn onderdeel van de ingewikkelde processen van hartontwikkeling en regulatie van het hartritme. Hierbij spelen meerdere celtypes, hun interacties en orgaanstructuur een belangrijke rol, waardoor het nodig blijft ook dierproeven te doen.
- 
- 4.2 **Vermindering**  
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- We voeren een statistische berekening uit waarmee we bepalen hoe we met zo min mogelijk dieren de vraagstelling op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden.
- We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen. Voor die nieuwe vragen zijn dan geen nieuwe proefdieren nodig.
- 
- 4.3 **Verfijning**  
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van het hartritme in de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. We onderzoeken hartfunctie in levende muizen en in geïsoleerde harten. Hiervoor hebben we onlangs geïnvesteerd in een nieuwe elektrische en optische meetopstelling waarmee we hele kleine verschillen in eigenschappen zoals bijv. geleidingssnelheid kunnen vinden. Hierdoor zijn minder muizen nodig om verschillen aan te tonen, wat bijdraagt aan verfijning en aan vermindering.
- 
- Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- Als onderdeel van de verfijning van de dierproef zetten wij ervaren biotechnici in bij de handelingen aan de proefdieren. Dit vermindert voor een groot deel de stress en het lijden ten gevolge van de handelingen. Als de muizen een kans lopen op pijn door de handelingen wordt pijnbestrijding toegepast. De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze kort aan mogelijke stress blootstaan. Alle dieren in het experiment worden regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart"/> |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit type dierproef bestuderen we de rol van genen en regel-elementen in de ontwikkeling, (elektrische) functie en regeneratie van het hart. We onderzoeken genetisch gemodificeerde muizen, reeds bestaand of verkregen via "genome editing" (CRISPR-Cas9). Het betreft knock-outs, knock-ins en gecombineerde transgenen (■■■■■-induceerbare knock-outs (Cre-loxP) of gecombineerde modificaties). We onderzoeken in deze muizen de effecten van de gemodificeerde genen en regel-elementen op de 1) ontwikkelingen van hart we via isolatie van embryo's en foetussen, 2) (elektrische) functie van het hart door het meten van elektrische en optische signalen, en 3) regeneratieve response van het hart door chirurgisch induceren van een hartinfarct.

Op diverse niveaus en leeftijden wordt de ontwikkeling, functie en regeneratie van het hart bestudeerd, opgedeeld in de volgende onderdelen:

#### 1. Gezondheid monitoring en initiële analyse van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen

Nadat we founders krijgen van de ■■■■■, zullen deze 2 generaties gefokt worden terwijl de gezondheid gemonitord wordt. Om tijd en dieren te sparen worden jonge muizen (4-8 weken) van de tweede generatie gebruikt voor een initiële analyse van genexpressie in geïsoleerde weefsels om te bepalen of de modificatie in de nieuwe lijn een biologisch effect heeft. Uitkomstparameters: effecten op niveau van genexpressie.

#### 2. Elektrofysiologische karakterisatie muis

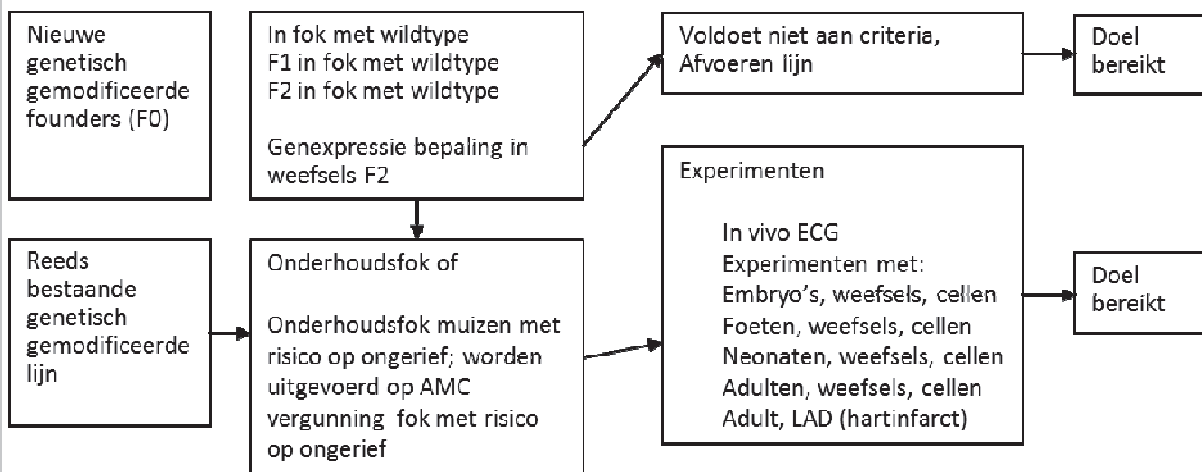
In dit experiment testen we of de genetische modificatie leidt tot elektrofysiologische veranderingen van het hart. We zullen levende transgene muizen onderzoeken onder anaesthesie met behulp van een electrocardiogram (ECG). uitkomstparameters: QRS-duur, PR-interval, hartritme en QT-tijd.

### 3. Karakterisatie ontwikkeling en functie

In dit experiment worden muizen (embryonale dag 7.5-18.5, neonaat tot en met adult) geofferd zonder voorafgaande handeling om hieruit weefsels te isoleren. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.

### 4. Regeneratie na hartinfarct

In volwassen transgene en controle dieren zal een hartinfarct (MI) worden geïnduceerd. In een deel van de dieren wordt op verschillende momenten na de inductie een stof (eiwitoplossingen zoals [REDACTED]) ingespoten die regeneratie stimuleert ([REDACTED]) (veroorzaakt geen additioneel ongerief). Tevens wordt voor, tijdens en na het induceren van het infarct een ECG afgenomen onder anesthesie. Aan einde van dierproef worden weefsels geïsoleerd voor verdere analyse. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.



Alle experimenten hierboven beschreven staan in het teken van het ophelderen van de functie van geselecteerde genen en regel-elementen in de ontwikkeling, regeneratie en elektrofysiologische functie van het hart, en de bijdrage van modificaties in deze genen en regel-elementen aan aangeboren hartafwijkingen, regeneratie en ritmestoornissen.

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

#### Twee generaties fok en initiële analyse nieuwe genetisch gemodificeerde lijn.

Handeling: offeren van muis zonder voorafgaande handeling

De founder (F0) wordt gekruist met een wildtype dier. De eerste generatie nakomelingen (F1) wordt gecontroleerd op kiembaan transmissie van de modificatie. Gemodificeerde dieren worden gebruikt voor het genereren tweede generatie (F2). 5 transgene F2 muizen en 5 wildtype nestgenootjes worden geëuthanaseerd om weefsels te isoleren voor genexpressie bepaling (qPCR). 5 dieren worden aangehouden om naar de fokunit over te plaatsen om de lijn aan te houden, tenzij de genexpressie analyse uitwijst dat de modificatie geen biologisch effect heeft. In dat geval wordt de lijn getermineerd. Van alle muizen wordt de gezondheid gemonitord. Bij vaststelling risico ongerief wordt de lijn overgeplaatst op protocol fokken met ongerief risico.

#### Het meten van het ECG van levende muizen.

Handelingen: Afnames van ECGs op verschillende tijdstipmomenten.

Aanpak: De muizen worden verdoofd met 4% isofluraan in 1L/min O<sub>2</sub> waarna aan alle vier de poten een elektrode zal worden bevestigd. Gedurende vijf minuten zal een ECG worden afgeleid om PQ, QRS, RR en QT intervallen te bepalen. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na het laatste ECG wordt de muis gedood en het hart geïsoleerd en verder geanalyseerd—Het ECG geeft inzicht in de elektrische functie van het hart en is een non-invasieve methode waardoor we eenzelfde muis op

verschillende tijdstipmomenten kunnen te bemeten.

### **Weefsel isolatie uit embryo's, neonaten en volwassen dieren**

Handelingen: offeren van muis zonder voorafgaande handeling.

Aanpak: voor adulten, offeren van de muis en daarna weefsel isolatie. Het doden van dieren wordt gedaan volgens richtlijn 2010/63/EU (ongerief licht).

Voor neonaten: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt, blijft het koppel instaan en uit dit koppel worden pups geboren. Deze worden op verschillende dagen na de geboorte (neonatale stadia) geanalyseerd. Op de dag van isolatie zullen de pups van de moeder worden weggenomen. Offeren van pups en daarna weefsel isolatie.

Kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt.

Handeling adulten: ████████ injecties; offeren

Aanpak: Muizen worden voor inductie van de genexpressie behandeld met ████████ voor max 4 dagen. Intraperitoneale toediening (ongerief licht) of oraal toedienen dmv een gavage naald (ongerief licht) of intragastraal toedienen dmv injectienaald (ongerief licht). Volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn Diehl et al 2001.

### **Embryo/foeten isolatie**

Handelingen: muis drachtig laten worden; echo; ████████ injecties; offeren

Aanpak: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt het koppel uit elkaar gehaald. De plug wordt gezien als embryonaal stadium (E)0.5. Er zullen embryo's en foeten geïsoleerd worden vanaf E7.5 tot en met E18.5. Als er vroege stadia embryo's worden geïsoleerd (tot en met E10.5), zal er eerst een echo gemaakt worden om te kijken of de muis daadwerkelijk drachtig is. Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn. Vanaf E11.5 is het voor de diervverzorgers met het oog zichtbaar of het vrouwtje drachtig is of niet. In het geval van een kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt, zal ████████ worden toegediend aan de moeder. Na het offeren van de drachtige muis wordt de uterus verwijderd en in ijskoude PBS gedaan. In deze ijskoude PBS worden de embryo's geïsoleerd. Deze zullen worden gefixeerd in 4% PFA of bevroren worden in vloeibare stikstof. Embryo's ouder dan E12.5 worden eerst gedecapiteerd en de borstkas wordt geopend zodat de formaldehyde beter doordringt tot hart en andere organen.

### **Inductie hartinfarct**

Handeling: bloedafnames; ████████ injecties; kransslagaderligatie

Onder algehele anaesthesie en adequate analgesie zal bij de muizen een permanente ligatie van de linker kransslagader worden aangebracht (ongerief matig). De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen voor/tijdens en na de operatie pijnstilling krijgen. Voorafgaand aan de operatie wordt bloed afgenomen voor biochemische/immunologische bepalingen, volgens richtlijn <https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling> (ongerief licht). Na de operatie worden de muizen individueel gehuisvest om goed te kunnen herstellen. De dieren zullen na de operatie voor een bepaalde periode gevolgd worden. In subgroepen dieren wordt meermaals een stof ingespoten, zoals opgeloste eiwitten ████████, die een invloed heeft op regeneratie-gerelateerde processen (volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn ████████, ongerief gering). Na deze periode zal van de dieren een ECG worden afgeleid onder anesthesie waarna het dier wordt geofferd voor weefselisolatie.

---

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

Power berekeningen, met een power van 0.8 en een alpha van 0,05, worden gebruikt om het minimum aantal benodigde dieren te berekenen dat nodig is om een bestaand verschil statistisch significant waar te nemen, zoals beschreven in de artikelen van Lenth: [http://conium.org/~maccoun/PP279\\_Lenth.pdf](http://conium.org/~maccoun/PP279_Lenth.pdf) en Charan en Kantharia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826013/>). Om een verschil tussen de gemiddelden van de twee groepen te meten, is het nodig te weten hoe groot dat verschil is ten opzichte van de standaard deviatie in ieder van de groepen. Voor een relatief verschil (experimenteel ten opzichte van controle) is een schatting van de standaard deviatie van deze ratio nodig. Aangezien we op dit moment geen experimentele data hebben mbt de individuele genen, nemen we voor de schatting de grootste bron van variatie, de biologische variatie, waarvan we uit eerdere experimenten weten dat die tussen de 20 en



30% (CV=0.2 -0.3) ligt. Aangezien de biologische variatie voor zowel de controle als de experimentele groep geldt, kan hieruit met doorwerking van fouten de standaard deviatie van de ratio worden berekend (SD-ratio). In onderstaande tabel staat voor een aantal mogelijke relatieve verschillen en een reeks van CVs het minimaal aantal dieren per groep dat nodig is om het verschil aan te tonen als het werkelijk aanwezig is.

alpha	0.05				
power	0.8				
	CV (Biologische variatie)				
	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4
	SD-Ratio				
Rel Verschil	0.14	0.28	0.35	0.42	0.57
1.25	5.0	20.1	31.4	45.2	80.4
1.50	1.3	5.0	7.8	11.3	20.1
2.00	0.3	1.3	2.0	2.8	5.0
2.50	0.1	0.6	0.9	1.3	2.2
3.00	0.1	0.3	0.5	0.7	1.3
5.00	0.0	0.1	0.1	0.2	0.3

Wanneer er experimentele waardes uit pilotexperimenten bekend zijn, zal er met de gegevens powerberekening wordt uitgevoerd met software voor groepsgruotteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower). De aantallen uit tabel die in rood zijn aangegeven vinden wij niet acceptabel. Eerder gepubliceerde onderzoeken van onze groep laten zien dat een groepsgruotte tussen 5 en 10 dieren vaak voldoende blijkt om functioneel relevante verschillen aan te tonen. ( )

## B. De dieren

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

**Diersoorten:** Muizen, zowel wildtype en genetische veranderde dieren. Als controles worden, daar waar mogelijk, wildtype nakomelingen gebruikt. Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat de groep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit goede en geaccepteerde modellen zijn voor de beschreven ziektes.

**Herkomst:** In dit experiment worden muizen gebruikt, welke voortkomen uit eigen fok of zelf gecreëerd zijn met behulp van CRISPR/Cas9 techniek, of worden verkregen van een commerciële afleveringsbedrijf of van een andere onderzoeksgroep.

**Levensstadia:** Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. De leeftijden lopen van embryonaal tot adult. Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen door elkaar heen worden gebruikt.

**Geschatte aantallen:** De geschatte aantallen per proef zoals hierboven berekend zijn gebaseerd op statistische berekeningen, rekening houdend met uitval, gebaseerd op eigen ervaring of ervaring van naaste collega's, en rekening houdend met de hoeveelheden cellen/weefsel die nodig zijn voor de beschreven analyses. Het aantal proeven is gebaseerd op ervaring van de onderzoeksgroep, rekening houdend met de grootte van de onderzoeksgroep en verwachte aantallen experimenten die we willen en kunnen uitvoeren. Voor bovenstaande experimenten worden daarom de volgende maximale hoeveelheden dieren aangevraagd:

1. Elektrofysiologische karakterisatie muis: Van 20 dieren per lijn ECGs afnemen; 50 lijnen in 5 jaar: 20 x 50 = 1000 ECGs. Deze muizen zullen na het meten van de laatste ECG geofferd worden, waarbij zij dan vallen onder punt 3. Onder dit punt worden dus geen muizen geofferd.
2. Twee generaties fok nieuwe genetisch gemodificeerde lijn: 1 founder, 20 F1 muizen en 30 F2 muizen per lijn. 50 nieuwe lijnen in 5 jaar = max. **2550** muizen.
3. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie volwassen hart: Verwachting: 40 lijnen per 5 jaar (niet alle lijnen uit punt 2 worden volledig onderzocht). Per lijn 30 adulte muizen (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 15 heterozygoten, 15 homozygoten; diverse analyses) = 40 x 35 = **1400**.
4. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie neonatale hart. Per lijn 75 neonaten (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 10 heterozygoten, 10 homozygoten; 3 stadia, diverse analyses). 15

lijnen in 5 jaar: **1125**.

5. Karakterisatie van de prenatale ontwikkeling en functie: Per lijn 24 drachtige muizen, waarvan 40% E14.5 en ouder zal zijn. Gemiddeld aantal embryo's/voeten per nest: 10; 25 lijnen in 5 jaar: 14 moeders+10 moeders +(10 x 10 voeten) x 25 = **3100** muizen.

6. Regeneratie na hartinfarct: maximaal 5 lijnen per jaar. Hierbij wordt in 3 groepen per lijn (wildtypes, enkel transgen/heterozygoot en gecombineerde allelen / homozygoten) een hartinfarct geïnduceerd. Voor een volledige analyse zijn maximaal 60 muizen per lijn nodig = 300 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = **1500** muizen.

De som van de dikgedrukte getallen geeft een totaal van maximaal 9.675 dieren voor de periode van 5 jaar. Deze aantallen zullen alleen gehaald worden als voor elke lijn het maximale aantal analyses wordt uitgevoerd.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### Vervanging:

We zullen zoveel mogelijk van het voorwerk uitvoeren met proefdierlijke methodes; te weten analyses van de werking van genetische elementen in celweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. In vivo werken de genetische elementen in de context van het uiterst complexe proces van hartontwikkeling en ritmeregulatie. Bij deze processen spelen verschillende celtypen een rol, waarbij hun interacties en de veranderende orgaanstructuur een belangrijke rol spelen. Als gevolg van deze complexiteit is het niet mogelijk dit proces volledig in vitro na te bootsen. Om de normale en/of afwijkende ontwikkeling en functie van het hart te kunnen onderzoeken is een dierproef noodzakelijk. We achten daarom deze dierexperimenten essentieel voor het bereiken van het onderzoeksdoel.

#### Vermindering:

We voeren een statistische berekening uit waarmee we kunnen inschatten hoe we met zo min mogelijk dieren, toch de vraag op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden. Tevens worden genetische elementen voorafgaand aan een dierproef uitgebreid bioinformatisch, in patiëntmateriaal en in in vitro kweeksystemen geanalyseerd.

Door tegelijkertijd met de gezondheidsmonitoring een eerste validatie van de muizenlijn op genexpressie niveaus uit te voeren, kan al in een vroeg stadium bepaald worden of de genetische verandering in de muizenlijn een voldoende groot effect heeft voor het beoogde onderzoek. Mocht dit niet het geval zijn, dan wordt de lijn getermineerd en zullen er dus geen verdere experimenten met deze lijn worden uitgevoerd. Deze stap zorgt voor een vermindering van het aantal proefdieren, maar ook van het aantal muizenlijnen dat in onderhoudsfok staat. Op grond van deze eerste genexpressie analyse zal per lijn bepaald worden welke van de experimenten de beste informatie zullen opleveren over het effect van de modificatie. Met andere woorden, niet alle in deze aanvraag beschreven experimenten zullen op alle te genereren muizenlijnen worden uitgevoerd.

Door zowel mannen als vrouwen te gebruiken voor deze experimenten worden er minder dieren uit voorraad gedood dan bij het gebruik van slechts een geslacht.

We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen, zonder dat hier een nieuwe dierproef voor hoeft te worden ingezet. Meerdere ECGs kunnen worden uitgevoerd op hetzelfde dier om de technische variatie te verkleinen en eventuele tijdsgebonden processen te volgen.

#### *Verfijning:*

Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van ritme in de mens ( ). We nemen ECGs af van muizen omdat het ECG de voorkeursmethode in de kliniek is om elektrische hartfunctie van patiënten te meten. Dit maakt het mogelijk om de bevinding in de muis te transleren naar de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. Daarnaast worden de analysemethodes zoveel mogelijk verfijnd en hebben we geïnvesteerd in nieuwe ECG apparatuur waarmee we hoogwaardige ECGs kunnen afnemen.

De verdere karakterisering van hartfunctie wordt ex vivo uitgevoerd met behulp van een Langendorff-perfusie-opstelling. Met deze methode is het mogelijk een zeer hoge resolutie in tijd en ruimte te bereiken waardoor kleine maar significante verschillen met een minimaal aantal muizen kunnen worden aangetoond. Deze meeting en interventies zullen door ervaren analisten worden uitgevoerd, zodat technische mislukkingen tot een minimum worden beperkt.

Wanneer er embryo's of foeten moeten worden geïsoleerd, zal het vrouwtje alleen worden geofferd wanneer zij uiterlijk kenmerken van drachtigheid vertoont. Wanneer wel een zwangerschap wordt verwacht en er geen of onvoldoende uiterlijke kenmerken zijn, dan zal met een echo bepaald worden of het vrouwtje daadwerkelijk drachtig is. Bij weghalen bij moeder van pups tot speenleeftijd (21 dagen) er altijd zorg voor worden gedragen dat er 2 pups bij de moeder achterblijven om stuning van de moedermelk en borstontsteking te voorkomen.

De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk weer teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze steeds maar kort aan de mogelijke stress door de handelingen blootstaan. Alle dieren in experiment worden heel regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. Tijdens en na de MI operatie wordt pijnstilling gegeven.

---

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

Door de dieren voor het euthanaseren door middel van cervicale dislocatie te bedwelmen met CO<sub>2</sub>, wordt pijn en angst voor de dieren tot een minimum beperkt.

In een klein deel van de muizen wordt toegediend. Het toedienen wordt gedaan door biotechnici die veel ervaring hebben om het ongerief tot een minimum beperkt.

Bij muizen met een hartinfarct zal goede monitoring helpen voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niveau wordt overschreden en indien de humane eindpunten worden bereikt worden de dieren geëuthanaseerd. Pijnstilling wordt systemisch en lokaal gegeven tijdens en na operaties.

Alle dieren worden op D1 niveau gehuisvest.

---

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

NVT.

---

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de

---

dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Na de hartinfarct (MI) operatie zullen de muizen individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat kooigenoten de hechtingen openknagen wat tot ernstig ongerief leidt. Tevens hebben we in het verleden waargenomen dat wanneer een kooigenoten meer ongerief ondervinden dan een van de andere kooigenoten, de kooigenoot met het minste ongerief dominant gedrag vertoont, wat het ongerief van de andere kooigenoten versterkt. Dit gedrag is sterker bij mannen dan bij vrouwen. De mannelijke muizen worden maximaal 1 maand individueel gehuisvest, aangezien het samen huisvesten van mannelijke muizen na separatie niet mogelijk is zonder kans op vechten. De vrouwelijke muizen worden maximaal 1 week individueel gehuisvest, zodat de wond optimaal kan genezen. Hierna worden zij weer in groepsverband gehuisvest.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Om pijn bij embryo's en foeten te voorkomen wordt de uterus met de embryo's/foeten overgebracht naar ijskoude fysiologische zout oplossing. Door de hypothermie zullen de embryo's overlijden en de foeten verdoofd raken. De foeten worden vervolgens gedood door decapitatie.

Wanneer een ECG afgeleid wordt zal het dier verdoofd worden met isofluraan omdat de dieren stil moeten liggen om een betrouwbaar ECG af te kunnen leiden. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na de afname van het laatste ECG wordt het dier gedood voordat het bijkomt uit de narcose, en worden de organen geïsoleerd voor analyse. Door deze handelingen te combineren wordt het ongerief beperkt.

Na de kransslagader ligaties voor de hartinfarct experimenten kunnen de muizen pijn ondervinden. De operaties gebeuren onder algehele verdoving en de muizen worden voor/tijdens en na de operatie behandeld met pijnstilling. De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen na de operatie pijnstilling ontvangen. De dieren zullen tijdens de operatie op een warmtemat worden geplaatst. Daarnaast krijgen de dieren minimaal 3 dagen na de operatie hoogenergetisch natgemaakt voer. De dieren worden minimaal 1 week dagelijks gemonitord, en zodra de situatie het toelaat twee keer per week gemonitord.

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Echo om jonge zwangerschap vast te stellen: Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn (ongerief: licht).

Toediening t[REDACTED].

Fok met risico op ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij injectie t[REDACTED]: irritatie van plaats van injectie.

Bij fok met ongerief: het eventuele ongerief als gevolg van de genetische modificatie zal zich waarschijnlijk uiten in hartfalen.

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

De toedieningen worden uitgevoerd door ervaren biotechnici.

Als het risico op ongerief groot is (meer dan een kwart van de dieren heeft ernstig ongerief) zal de lijn getermineerd worden.

## J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Algemeen: Bij het bereiken van humane eindpunten, zoals het ontwikkelen van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, afwezige voedselinname, of diarree – over een periode van 2-3 dagen, het aantreffen van wonden, of meer dan 10% gewichtsverlies in een week.

Hartinfarct operatie: Tijdens operatie: veel bloedverlies. De eerste week postoperatief: ernstige infectie van de wond, 15% gewichtsverlies ten opzichte van gewicht voor operatie. Uitingen van acuut hartfalen: verminderde activiteit, slecht poetsen, extreme kortademigheid, opgebolde rug, als er de dieren weer op uitgangsgewicht gekomen zijn, 8% gewichtsverlies in 1 dag of meer dan 10% in 2 dagen.

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

Minder dan 1% voor alle niet invasieve experimenten en voor de muizen die een hartinfarct ondergaan verwachten we dat dit 20% is [REDACTED]

## K. Classificatie van ongerief

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

De voor de meeste muizen die op dit protocol worden gebruikt, wordt het ongerief geclassificeerd als licht omdat er bij deze muizen geen handeling worden uitgevoerd voor het doden (max. 8175 muizen).

Wanneer er tijdens het leven van een muis een ECG afgenomen wordt, dan wordt het ongerief geclassificeerd als matig als gevolg van het bijkomen uit de narcose (max. 1000 muizen).

Voor een muis waaraan [REDACTED] wordt toegediend, wordt het ongerief geclassificeerd als licht (afhankelijk van gebruik aantal conditionele lijnen (max 1000 muizen) + 500 muizen na infarct).

■■■■-De muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1200).  
20% van de geopereerde muizen (max. 300), ■■■■ kunnen hartfalen ontwikkelen. Dit valt onder de humane eindpunten en deze muizen zullen bij constatering direct gedood worden. Door het uitvoeren van de humane eindpunten blijft het ongerief als matig geclassificeerd. ■■■■  
■■■■

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Er dienen organen geïsoleerd te worden voor verdere analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**Van:** [REDACTED] namens Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 20 september 2017 14:53  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD1180020172348

Geachte meneer, mevrouw,

Op 18 september 2017 hebben wij aanvullende informatie van u ontvangen over uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348.

Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u de term 'intraperitoneale injectie' anders beschrijft of uitlegt? Deze term is voor een leek niet begrijpelijk. Kunt u in de NTS onder 3.5 ook aangeven hoeveel dieren, in aantal of percentage, naar verwachting welke cumulatieve ongeriefsclassificatie zullen ondergaan?

Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin u onder K het aantal of percentage van iedere cumulatieve ongeriefsclassificatie aangeeft? Een optelling van de door u gehanteerde getallen geeft een hoger aantal dieren dan waar de aanvraag betrekking op heeft. Hierdoor is het niet duidelijk hoeveel dieren welk ongerief ondergaan.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze e-mail op.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

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



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart"/> |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit type dierproef bestuderen we de rol van genen en regel-elementen in de ontwikkeling, (elektrische) functie en regeneratie van het hart. We onderzoeken genetisch gemodificeerde muizen, reeds bestaand of verkregen via "genome editing" (CRISPR-Cas9). Het betreft knock-outs, knock-ins en gecombineerde transgenen (■■■■■-induceerbare knock-outs (Cre-loxP) of gecombineerde modificaties). We onderzoeken in deze muizen de effecten van de gemodificeerde genen en regel-elementen op de 1) ontwikkelingen van hart we via isolatie van embryo's en foetussen, 2) (elektrische) functie van het hart door het meten van elektrische en optische signalen, en 3) regeneratieve response van het hart door chirurgisch induceren van een hartinfarct.

Op diverse niveaus en leeftijden wordt de ontwikkeling, functie en regeneratie van het hart bestudeerd, opgedeeld in de volgende onderdelen:

#### 1. Gezondheid monitoring en initiële analyse van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen

Nadat we founders krijgen van de ■■■■■, zullen deze 2 generaties gefokt worden terwijl de gezondheid gemonitord wordt. Om tijd en dieren te sparen worden jonge muizen (4-8 weken) van de tweede generatie gebruikt voor een initiële analyse van genexpressie in geïsoleerde weefsels om te bepalen of de modificatie in de nieuwe lijn een biologisch effect heeft. Uitkomstparameters: effecten op niveau van genexpressie.

#### 2. Elektrofysiologische karakterisatie muis

In dit experiment testen we of de genetische modificatie leidt tot elektrofysiologische veranderingen van het hart. We zullen levende transgene muizen onderzoeken onder anaesthesie met behulp van een electrocardiogram (ECG). uitkomstparameters: QRS-duur, PR-interval, hartritme en QT-tijd.

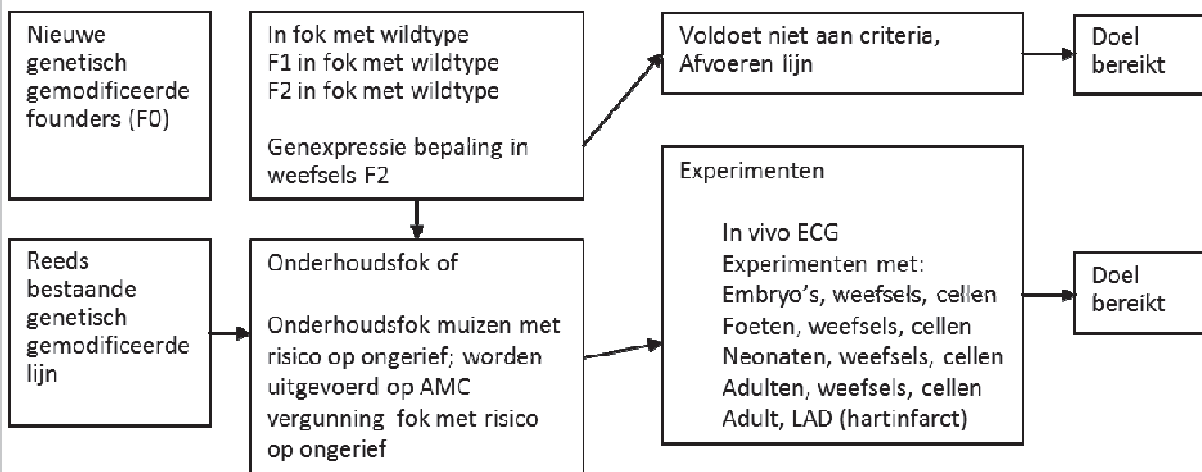


### 3. Karakterisatie ontwikkeling en functie

In dit experiment worden muizen (embryonale dag 7.5-18.5, neonaat tot en met adult) geofferd zonder voorafgaande handeling om hieruit weefsels te isoleren. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.

### 4. Regeneratie na hartinfarct

In volwassen transgene en controle dieren zal een hartinfarct (MI) worden geïnduceerd. In een deel van de dieren wordt op verschillende momenten na de inductie een stof (eiwitoplossingen zoals [REDACTED]) ingespoten die regeneratie stimuleert ([REDACTED], [REDACTED]) (veroorzaakt geen additioneel ongerief). Tevens wordt voor, tijdens en na het induceren van het infarct een ECG afgenomen onder anesthesie. Aan einde van dierproef worden weefsels geïsoleerd voor verdere analyse. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.



Alle experimenten hierboven beschreven staan in het teken van het ophelderen van de functie van geselecteerde genen en regel-elementen in de ontwikkeling, regeneratie en elektrofysiologische functie van het hart, en de bijdrage van modificaties in deze genen en regel-elementen aan aangeboren hartafwijkingen, regeneratie en ritmestoornissen.

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

#### Twee generaties fok en initiële analyse nieuwe genetisch gemodificeerde lijn.

Handeling: offeren van muis zonder voorafgaande handeling

De founder (F0) wordt gekruist met een wildtype dier. De eerste generatie nakomelingen (F1) wordt gecontroleerd op kiembaan transmissie van de modificatie. Gemodificeerde dieren worden gebruikt voor het genereren tweede generatie (F2). 5 transgene F2 muizen en 5 wildtype nestgenootjes worden geëuthanaseerd om weefsels te isoleren voor genexpressie bepaling (qPCR). 5 dieren worden aangehouden om naar de fokunit over te plaatsen om de lijn aan te houden, tenzij de genexpressie analyse uitwijst dat de modificatie geen biologisch effect heeft. In dat geval wordt de lijn getermineerd. Van alle muizen wordt de gezondheid gemonitord. Bij vaststelling risico ongerief wordt de lijn overgeplaatst op protocol fokken met ongerief risico.

#### Het meten van het ECG van levende muizen.

Handelingen: Afnames van ECGs op verschillende tijdstipmomenten.

Aanpak: De muizen worden verdoofd met 4% isofluraan in 1L/min O<sub>2</sub> waarna aan alle vier de poten een elektrode zal worden bevestigd. Gedurende vijf minuten zal een ECG worden afgeleid om PQ, QRS, RR en QT intervallen te bepalen. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na het laatste ECG wordt de muis gedood en het hart geïsoleerd en verder geanalyseerd—Het ECG geeft inzicht in de elektrische functie van het hart en is een non-invasieve methode waardoor we eenzelfde muis op

verschillende tijdstipmomenten kunnen te bemeten.

### **Weefsel isolatie uit embryo's, neonaten en volwassen dieren**

Handelingen: offeren van muis zonder voorafgaande handeling.

Aanpak: voor adulten, offeren van de muis en daarna weefsel isolatie. Het doden van dieren wordt gedaan volgens richtlijn 2010/63/EU (ongerief licht).

Voor neonaten: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt, blijft het koppel instaan en uit dit koppel worden pups geboren. Deze worden op verschillende dagen na de geboorte (neonatale stadia) geanalyseerd. Op de dag van isolatie zullen de pups van de moeder worden weggenomen. Offeren van pups en daarna weefsel isolatie.

Kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt.

Handeling adulten: [REDACTED] injecties; offeren

Aanpak: Muizen worden voor inductie van de genexpressie behandeld met [REDACTED] voor max 4 dagen. Intraperitoneale toediening (ongerief licht) of oraal toedienen dmv een gavage naald (ongerief licht) of intragastraal toedienen dmv injectienaald (ongerief licht). Volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn [REDACTED].

### **Embryo/foeten isolatie**

Handelingen: muis drachtig laten worden; echo; [REDACTED] injecties; offeren

Aanpak: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt het koppel uit elkaar gehaald. De plug wordt gezien als embryonaal stadium (E)0.5. Er zullen embryo's en foeten geïsoleerd worden vanaf E7.5 tot en met E18.5. Als er vroege stadia embryo's worden geïsoleerd (tot en met E10.5), zal er eerst een echo gemaakt worden om te kijken of de muis daadwerkelijk drachtig is. Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn. Vanaf E11.5 is het voor de diervverzorgers met het oog zichtbaar of het vrouwtje drachtig is of niet. In het geval van een kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt, zal [REDACTED] worden toegediend aan de moeder. Na het offeren van de drachtige muis wordt de uterus verwijderd en in ijskoude PBS gedaan. In deze ijskoude PBS worden de embryo's geïsoleerd. Deze zullen worden gefixeerd in 4% PFA of bevroren worden in vloeibare stikstof. Embryo's ouder dan E12.5 worden eerst gedecapiteerd en de borstkas wordt geopend zodat de formaldehyde beter doordringt tot hart en andere organen.

### **Inductie hartinfarct**

Handeling: bloedafnames; [REDACTED] injecties; kransslagaderligatie

Onder algehele anaesthesie en adequate analgesie zal bij de muizen een permanente ligatie van de linker kransslagader worden aangebracht (ongerief matig). De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen voor/tijdens en na de operatie pijnstilling krijgen. Voorafgaand aan de operatie wordt bloed afgenomen voor biochemische/immunologische bepalingen, volgens richtlijn <https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling> (ongerief licht). Na de operatie worden de muizen individueel gehuisvest om goed te kunnen herstellen. De dieren zullen na de operatie voor een bepaalde periode gevolgd worden. In subgroepen dieren wordt meermaals een stof ingespoten, zoals opgeloste eiwitten [REDACTED], die een invloed heeft op regeneratie-gerelateerde processen (volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn [REDACTED], ongerief gering). Na deze periode zal van de dieren een ECG worden afgeleid onder anesthesie waarna het dier wordt geofferd voor weefselisolatie.

---

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

Power berekeningen, met een power van 0.8 en een alpha van 0,05, worden gebruikt om het minimum aantal benodigde dieren te berekenen dat nodig is om een bestaand verschil statistisch significant waar te nemen, zoals beschreven in de artikelen van Lenth: [http://conium.org/~maccoun/PP279\\_Lenth.pdf](http://conium.org/~maccoun/PP279_Lenth.pdf) en Charan en Kantharia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826013/>). Om een verschil tussen de gemiddelden van de twee groepen te meten, is het nodig te weten hoe groot dat verschil is ten opzichte van de standaard deviatie in ieder van de groepen. Voor een relatief verschil (experimenteel ten opzichte van controle) is een schatting van de standaard deviatie van deze ratio nodig. Aangezien we op dit moment geen experimentele data hebben mbt de individuele genen, nemen we voor de schatting de grootste bron van variatie, de biologische variatie, waarvan we uit eerdere experimenten weten dat die tussen de 20 en

30% (CV=0.2 -0.3) ligt. Aangezien de biologische variatie voor zowel de controle als de experimentele groep geldt, kan hieruit met doorwerking van fouten de standaard deviatie van de ratio worden berekend (SD-ratio). In onderstaande tabel staat voor een aantal mogelijke relatieve verschillen en een reeks van CVs het minimaal aantal dieren per groep dat nodig is om het verschil aan te tonen als het werkelijk aanwezig is.

alpha	0.05				
power	0.8				
	CV (Biologische variatie)				
	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4
	SD-Ratio				
Rel Verschil	0.14	0.28	0.35	0.42	0.57
1.25	5.0	20.1	31.4	45.2	80.4
1.50	1.3	5.0	7.8	11.3	20.1
2.00	0.3	1.3	2.0	2.8	5.0
2.50	0.1	0.6	0.9	1.3	2.2
3.00	0.1	0.3	0.5	0.7	1.3
5.00	0.0	0.1	0.1	0.2	0.3

Wanneer er experimentele waardes uit pilotexperimenten bekend zijn, zal er met de gegevens powerberekening wordt uitgevoerd met software voor groeps-grootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower). De aantallen uit tabel die in rood zijn aangegeven vinden wij niet acceptabel. Eerder gepubliceerde onderzoeken van onze groep laten zien dat een groeps-grootte tussen 5 en 10 dieren vaak voldoende blijkt om functioneel relevante verschillen aan te tonen. ( )

## B. De dieren

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

**Diersoorten:** Muizen, zowel wildtype en genetische veranderde dieren. Als controles worden, daar waar mogelijk, wildtype nakomelingen gebruikt. Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat de groep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit goede en geaccepteerde modellen zijn voor de beschreven ziektes.

**Herkomst:** In dit experiment worden muizen gebruikt, welke voortkomen uit eigen fok of zelf gecreëerd zijn met behulp van CRISPR/Cas9 techniek, of worden verkregen van een commerciële afleveringsbedrijf of van een andere onderzoeksgroep.

**Levensstadia:** Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. De leeftijden lopen van embryonaal tot adult. Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen door elkaar heen worden gebruikt.

**Geschatte aantallen:** De geschatte aantallen per proef zoals hierboven berekend zijn gebaseerd op statistische berekeningen, rekening houdend met uitval, gebaseerd op eigen ervaring of ervaring van naaste collega's, en rekening houdend met de hoeveelheden cellen/weefsel die nodig zijn voor de beschreven analyses. Het aantal proeven is gebaseerd op ervaring van de onderzoeksgroep, rekening houdend met de grootte van de onderzoeksgroep en verwachte aantallen experimenten die we willen en kunnen uitvoeren. Voor bovenstaande experimenten worden daarom de volgende maximale hoeveelheden dieren aangevraagd:

1. Elektrofysiologische karakterisatie muis: Van 20 dieren per lijn ECGs afnemen; 50 lijnen in 5 jaar: 20 x 50 = 1000 ECGs. Deze muizen zullen na het meten van de laatste ECG geofferd worden, waarbij zij dan vallen onder punt 3. Onder dit punt worden dus geen muizen geofferd.
2. Twee generaties fok nieuwe genetisch gemodificeerde lijn: 1 founder, 20 F1 muizen en 30 F2 muizen per lijn. 50 nieuwe lijnen in 5 jaar = max. **2550** muizen.
3. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie volwassen hart: Verwachting: 40 lijnen per 5 jaar (niet alle lijnen uit punt 2 worden volledig onderzocht). Per lijn 30 adulte muizen (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 15 heterozygoten, 15 homozygoten; diverse analyses) = 40 x 35 = **1400**.
4. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie neonatale hart. Per lijn 75 neonaten (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 10 heterozygoten, 10 homozygoten; 3 stadia, diverse analyses). 15

lijnen in 5 jaar: **1125**.

5. Karakterisatie van de prenatale ontwikkeling en functie: Per lijn 24 drachtige muizen, waarvan 40% E14.5 en ouder zal zijn. Gemiddeld aantal embryo's/voeten per nest: 10; 25 lijnen in 5 jaar: 14 moeders+10 moeders +(10 x 10 voeten) x 25 = **3100** muizen.

6. Regeneratie na hartinfarct: maximaal 5 lijnen per jaar. Hierbij wordt in 3 groepen per lijn (wildtypes, enkel transgen/heterozygoot en gecombineerde allelen / homozygoten) een hartinfarct geïnduceerd. Voor een volledige analyse zijn maximaal 60 muizen per lijn nodig = 300 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = **1500** muizen.

De som van de dikgedrukte getallen geeft een totaal van maximaal 9.675 dieren voor de periode van 5 jaar. Deze aantallen zullen alleen gehaald worden als voor elke lijn het maximale aantal analyses wordt uitgevoerd.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### Vervanging:

We zullen zoveel mogelijk van het voorwerk uitvoeren met proefdier-vrije methodes; te weten analyses van de werking van genetische elementen in celweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. In vivo werken de genetische elementen in de context van het uiterst complexe proces van hartontwikkeling en ritmeregulatie. Bij deze processen spelen verschillende celtypes een rol, waarbij hun interacties en de veranderende orgaanstructuur een belangrijke rol spelen. Als gevolg van deze complexiteit is het niet mogelijk dit proces volledig in vitro na te bootsen. Om de normale en/of afwijkende ontwikkeling en functie van het hart te kunnen onderzoeken is een dierproef noodzakelijk. We achten daarom deze dierexperimenten essentieel voor het bereiken van het onderzoeksdoel.

#### Vermindering:

We voeren een statistische berekening uit waarmee we kunnen inschatten hoe we met zo min mogelijk dieren, toch de vraag op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden. Tevens worden genetische elementen voorafgaand aan een dierproef uitgebreid bioinformatisch, in patiëntmateriaal en in in vitro kweeksystemen geanalyseerd.

Door tegelijkertijd met de gezondheidsmonitoring een eerste validatie van de muizenlijn op genexpressie niveaus uit te voeren, kan al in een vroeg stadium bepaald worden of de genetische verandering in de muizenlijn een voldoende groot effect heeft voor het beoogde onderzoek. Mocht dit niet het geval zijn, dan wordt de lijn getermineerd en zullen er dus geen verdere experimenten met deze lijn worden uitgevoerd. Deze stap zorgt voor een vermindering van het aantal proefdieren, maar ook van het aantal muizenlijnen dat in onderhoudsfok staat. Op grond van deze eerste genexpressie analyse zal per lijn bepaald worden welke van de experimenten de beste informatie zullen opleveren over het effect van de modificatie. Met andere woorden, niet alle in deze aanvraag beschreven experimenten zullen op alle te genereren muizenlijnen worden uitgevoerd.

Door zowel mannen als vrouwen te gebruiken voor deze experimenten worden er minder dieren uit voorraad gedood dan bij het gebruik van slechts een geslacht.

We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen, zonder dat hier een nieuwe dierproef voor hoeft te worden ingezet. Meerdere ECGs kunnen worden uitgevoerd op hetzelfde dier om de technische variatie te verkleinen en eventuele tijdsgebonden processen te volgen.

#### *Verfijning:*

Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van ritme in de mens (J. Physiol. 592:4613-26, 2014). We nemen ECGs af van muizen omdat het ECG de voorkeursmethode in de kliniek is om elektrische hartfunctie van patiënten te meten. Dit maakt het mogelijk om de bevinding in de muis te transleren naar de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. Daarnaast worden de analysemethodes zoveel mogelijk verfijnd en hebben we geïnvesteerd in nieuwe ECG apparatuur waarmee we hoogwaardige ECGs kunnen afnemen.

De verdere karakterisering van hartfunctie wordt ex vivo uitgevoerd met behulp van een Langendorff-perfusie-opstelling. Met deze methode is het mogelijk een zeer hoge resolutie in tijd en ruimte te bereiken waardoor kleine maar significante verschillen met een minimaal aantal muizen kunnen worden aangetoond. Deze meeting en interventies zullen door ervaren analisten worden uitgevoerd, zodat technische mislukkingen tot een minimum worden beperkt.

Wanneer er embryo's of foeten moeten worden geïsoleerd, zal het vrouwtje alleen worden geofferd wanneer zij uiterlijk kenmerken van drachtigheid vertoont. Wanneer wel een zwangerschap wordt verwacht en er geen of onvoldoende uiterlijke kenmerken zijn, dan zal met een echo bepaald worden of het vrouwtje daadwerkelijk drachtig is. Bij weghalen bij moeder van pups tot speenleeftijd (21 dagen) er altijd zorg voor worden gedragen dat er 2 pups bij de moeder achterblijven om stuning van de moedermelk en borstontsteking te voorkomen.

De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk weer teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze steeds maar kort aan de mogelijke stress door de handelingen blootstaan. Alle dieren in experiment worden heel regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. Tijdens en na de MI operatie wordt pijnstilling gegeven.

---

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

Door de dieren voor het euthanaseren door middel van cervicale dislocatie te bedwelmen met CO<sub>2</sub>, wordt pijn en angst voor de dieren tot een minimum beperkt.

In een klein deel van de muizen wordt ██████████ toegediend. Het toedienen wordt gedaan door biotechnici die veel ervaring hebben om het ongerief tot een minimum beperkt.

Bij muizen met een hartinfarct zal goede monitoring helpen voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niveau wordt overschreden en indien de humane eindpunten worden bereikt worden de dieren geëuthanaseerd. Pijnstilling wordt systemisch en lokaal gegeven tijdens en na operaties.

Alle dieren worden op D1 niveau gehuisvest.

---

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

NVT.

---

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de

---

dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Na de hartinfarct (MI) operatie zullen de muizen individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat kooigenoten de hechtingen openknagen wat tot ernstig ongerief leidt. Tevens hebben we in het verleden waargenomen dat wanneer een kooigenoten meer ongerief ondervinden dan een van de andere kooigenoten, de kooigenoot met het minste ongerief dominant gedrag vertoont, wat het ongerief van de andere kooigenoten versterkt. Dit gedrag is sterker bij mannen dan bij vrouwen. De mannelijke muizen worden maximaal 1 maand individueel gehuisvest, aangezien het samen huisvesten van mannelijke muizen na separatie niet mogelijk is zonder kans op vechten. De vrouwelijke muizen worden maximaal 1 week individueel gehuisvest, zodat de wond optimaal kan genezen. Hierna worden zij weer in groepsverband gehuisvest.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Om pijn bij embryo's en foeten te voorkomen wordt de uterus met de embryo's/foeten overgebracht naar ijskoude fysiologische zout oplossing. Door de hypothermie zullen de embryo's overlijden en de foeten verdoofd raken. De foeten worden vervolgens gedood door decapitatie.

Wanneer een ECG afgeleid wordt zal het dier verdoofd worden met isofluraan omdat de dieren stil moeten liggen om een betrouwbaar ECG af te kunnen leiden. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na de afname van het laatste ECG wordt het dier gedood voordat het bijkomt uit de narcose, en worden de organen geïsoleerd voor analyse. Door deze handelingen te combineren wordt het ongerief beperkt.

Na de kransslagader ligaties voor de hartinfarct experimenten kunnen de muizen pijn ondervinden. De operaties gebeuren onder algehele verdoving en de muizen worden voor/tijdens en na de operatie behandeld met pijnstilling. De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen na de operatie pijnstilling ontvangen. De dieren zullen tijdens de operatie op een warmtemat worden geplaatst. Daarnaast krijgen de dieren minimaal 3 dagen na de operatie hoogenergetisch natgemaakt voer. De dieren worden minimaal 1 week dagelijks gemonitord, en zodra de situatie het toelaat twee keer per week gemonitord.

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Echo om jonge zwangerschap vast te stellen: Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn (ongerief: licht).

Toediening [REDACTED].

Fok met risico op ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij injectie [REDACTED]: irritatie van plaats van injectie.

Bij fok met ongerief: het eventuele ongerief als gevolg van de genetische modificatie zal zich waarschijnlijk uiten in hartfalen.

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

De toedieningen worden uitgevoerd door ervaren biotechnici.

Als het risico op ongerief groot is (meer dan een kwart van de dieren heeft ernstig ongerief) zal de lijn getermineerd worden.

## J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Algemeen: Bij het bereiken van humane eindpunten, zoals het ontwikkelen van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, afwezige voedselinname, of diarree – over een periode van 2-3 dagen, het aantreffen van wonden, of meer dan 10% gewichtsverlies in een week.

Hartinfarct operatie: Tijdens operatie: veel bloedverlies. De eerste week postoperatief: ernstige infectie van de wond, 15% gewichtsverlies ten opzichte van gewicht voor operatie. Uitingen van acuut hartfalen: verminderde activiteit, slecht poetsen, extreme kortademigheid, opgebolde rug, als er de dieren weer op uitgangsgewicht gekomen zijn, 8% gewichtsverlies in 1 dag of meer dan 10% in 2 dagen.

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

Minder dan 1% voor alle niet invasieve experimenten en voor de muizen die een hartinfarct ondergaan verwachten we dat dit 20% is (van den Borne SW, Cardiovasc Res. 2009. 84:273-82).

## K. Classificatie van ongerief

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

De voor de meeste muizen die op dit protocol worden gebruikt, wordt het ongerief geclassificeerd als licht omdat er bij deze muizen geen handeling worden uitgevoerd voor het doden (max. **4625** muizen).

Wanneer er tijdens het leven van een muis een ECG afgenomen wordt, dan wordt het ongerief geclassificeerd als matig als gevolg van het bijkomen uit de narcose (max. **2550** muizen).

Voor een muis waaraan [REDACTED] wordt toegediend, wordt het ongerief geclassificeerd als licht, (afhankelijk van gebruik aantal conditionele lijnen (max **1000** muizen).

De muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1500). Hiervan zullen er maximaal



500 een intraperitoneale injectie hebben ondergaan met [REDACTED] 20% van de geopereerde muizen (max. 300) kunnen hartfalen ontwikkelen. Dit valt onder de humane eindpunten en deze muizen zullen bij constatering direct gedood worden. Door het uitvoeren van de humane eindpunten blijft het ongerief als matig geclassificeerd.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Er dienen organen geïsoleerd te worden voor verdere analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31

1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD1180020172348

**Bijlagen**

1

Datum 26 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 18 en 22 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof verheldering van het ongerief van de dieren in zowel de Bijlage Dierproeven als de NTS.

### **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(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

De voorwaarde betreffende de rapportage geldt omdat de CCD hiermee vorm geeft aan de maatregelen die volgen uit het advies van het NCad; 'genetisch gemodificeerde dieren in voorraad gedood' en de oproep van de Staatssecretaris die volgt uit de voortgangsrapportage van 1 november 2015.

U kunt met uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 augustus 2017. 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 aanvullende algemene voorwaarde(n) 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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

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

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

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven



Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

**Datum:**  
26 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1180020172348



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Academisch Medisch Centrum  
**Adres:** Meibergdreef 31  
**Postcode en plaats:** 1105 AZ AMSTERDAM  
**Deelnemersnummer:** 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/Onderzoeker.  
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 september 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 september 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 augustus 2017, ontvangen op 24 augustus 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 en 22 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	9.675	42% Matig 58% Licht	

### Voorwaarden

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

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD1180020172348

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Elk jaar, voor 1 april, wordt op basis van de getallen benodigd voor de registratie voor de NVWA een rapportage gedaan betreffende de fok; het aanhouden van lijnen met ongerief. U beschrijft hierbij welke aantallen dieren in de fok zijn ingezet, voor het aantal dieren dat is gefokt beschrijft u hoeveel dieren in de experimenten zijn ingezet, hoeveel dieren in voorraad zijn gedood wegens ongeschikt genotype of in voorraad zijn gedood wegens overtollig. U licht hierbij ook toe welke maatregelen u neemt om het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen.



**Aanvraagnummer:**  
AVD1180020172348

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvereenigbaar 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD1180020172348

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

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

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