

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017818	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage				x		x	x		
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
6	Verzoek aanvulling				x		x	x		
7	Aanvullende informatie				x		x	x		
8	DEC advies			x						
9	Correspondentie				x		x	x		
10	Advies CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x	x		

116002017 & 18.



23 FEB. 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11600
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum
		KvK-nummer	27366422
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Albinusdreef 2
		Postbus	9600
		Postcode en plaats	2300 RC Leiden
		IBAN	NL11DEUT0451001400
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Leiden
Datum	20 - 02 - 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
- 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.

Verscheidende pathofysiologische veranderingen aan het hart kunnen leiden tot (dodelijke) hartritmestoornissen. De veranderingen uiten zich vooral in de volgende 3 pathologiën; i) hypertrofie (het groter wordt van de hartspiercel), ii) fibrosis of verbindweefseling (een toename in fibroblasten [bindweefselcellen]) en iii) oxidatieve stress (een toename in de productie van vrije zuurstofradicalen). Het is bekend dat deze 3 pathologiën ieder op hun eigen wijze tot elektrofysiologische veranderingen in de hartspiercel leiden en daarmee bijdragen aan een grotere kans op ritmestoornissen in zowel de boezems als kamers van het hart. Hoe dit precies gebeurt is echter niet duidelijk. Deze hartritmestoornissen (of aritmieën) zijn een groot en groeiend, wereldwijd probleem op zowel klinisch, wetenschappelijk als economisch vlak. Gezien de grote omvang van dit probleem is er de afgelopen decennia veel onderzoek gedaan naar hartritmestoornissen. Ondanks dat er door onderzoek meer bekend is over het ontstaan en de mechanismen achter hartritmestoornissen is de kennis nog verre van volledig. Mede door de tekortkomingen aan inzicht is de huidige behandeling van hartritmestoornissen relatief aspecifiek en beperkt. Deze behandelingen zijn gebaseerd op farmacologie, elektrische devices en weefselablatie. Zo heeft de farmacologische behandeling van hartritmestoornissen geen positieve invloed op de mortaliteit en heeft het een breed scala aan bijwerkingen zoals vermoeidheid, hypotensie, impotentie en schildklierafwijkingen. Tevens interacteren anti-aritmica vaak met andere medicijnen en kunnen deze medicijnen zelfs levensbedreigende hartritmestoornissen veroorzaken. Devices, zoals pacemakers en implantable cardiac defibrillators (ICDs), hebben hoge kosten en een groot risico op complicaties en device failure. Daarnaast worden de (vaak onterechte) electroshocks als zeer traumatiserend ervaren en kunnen deze shocks het hartweefsel beschadigen. Bij een ablatie wordt er middels een catheter opzettelijk hartspierweefsel vernietigd om zo de ritmestoornis te stoppen of te voorkomen. Echter is deze optie bij een grote populatie niet mogelijk daar dieper gelegen pro-aritmische hartweefsel vaak niet met de ablatie katheter bereikt kan worden. Gezien de invasieve aard van de ingreep is er een reële kans op complicaties zoals hart tamponade, CVA en vaatschade. Tevens kan er door het vernietigen van hartweefsel onomkeerbare geleidingsstoornissen ontstaan waardoor levenslange behandeling met een pacemaker noodzakelijk is.

Gezien het suboptimale karakter van de huidige therapieën zijn meer specifieke en effectieve behandelingen voor hartritmestoornissen wenselijk. Een alternatieve strategie voor de behandeling van aritmieën is een biologische therapie die de pathofysiologische processen van zieke hartspiercellen van binnenuit aanpakt op specifieke wijze. Een manier om dit te bewerkstelligen is door middel van genterapie, waarbij middels een vector (bijvoorbeeld virale deeltjes) genetisch materiaal de cel wordt ingebracht, waardoor de eigenschappen van de cel op specifieke en voordelige wijze kunnen worden veranderd. Door de zeer specifieke benadering van genterapie neemt de effectiviteit van de behandeling wellicht toe, terwijl met deze therapie het risico op bijwerkingen en complicaties significant zou kunnen afnemen. Nog belangrijker, door mogelijk herstel van de normale werking van de hartspiercel, biedt genterapie kans op genezing, iets dat met de huidige therapieën niet bereikt kan worden daar het alleen de symptomen bestrijdt. Samenvattend is er, gezien de ernstige tekortkomingen van de huidige therapieën, een significante en zeer welkome verbetering te verwachten met de ontwikkeling van genterapie voor hartritmestoornissen. Het potentieel van genterapie voor hartfalen wordt reeds onderzocht in enkele klinische studies (Hulot JS *et al.* Eur Heart J. 2016), echter is er tot op heden nog onvoldoende inzicht in moleculaire en cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan hartritmestoornissen om genterapie toe te passen. Om dit te bereiken is het noodzakelijk een beter mechanistisch inzicht te verkrijgen in hartritmestoornissen als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, om zo aangrijpingspunten te identificeren die vervolgens middels genterapie worden onderzocht op hun therapeutisch potentieel. Om dit op een gestructureerde, controleerbare doch flexibele wijze te onderzoeken is eerst *in vitro* onderzoek nodig, omdat dit type onderzoek deze condities inderdaad weet te creëren, zoals ook uit ons eerdere onderzoek is gebleken.

### 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?

De hoofddoelstelling van dit project richt zich op de vraag hoe de veranderingen in elektrische eigenschappen van hartspiercellen (zowel atriale als ventriculaire), als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, door middel van genetische interventies dusdanig kunnen worden aangepast zodat hiermee een positief effect (d.w.z. beëindigen/voorkomen) op hartritmestoornissen kan worden

bewerkstelligd. Om deze hoofddoelstelling te bereiken worden zowel *atriale als ventriculaire hartspiercellen uit twee dagen oude ratten pups* gebruikt om *in vitro* modellen van ritmestoornissen (als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress) te produceren om deze vervolgens te onderzoeken op potentiële aangrijpingspunten voor genterapeutische interventies, waarna deze interventies worden uitgevoerd om zo te vast te stellen of en hoe dit leidt tot het beëindigen dan wel voorkomen van de ritmestoornis.

De haalbaarheid van het project wordt gesteund door onze ruime ervaring met zowel het gebruik van cellen uit het neonatale ratten hart als de genterapeutische technieken en read-out systemen beschreven in dit projectvoorstel (

*In vitro* modellen gebaseerd op deze cellen hebben bij ons, maar ook bij anderen, aan de basis gestaan van belangrijke inzichten, getuige het grote aantal publicaties in gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften, proefschriften en subsidies (

### **3.3 Belang**

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

Medisch belang: Hartritmestoornissen blijven wereldwijd een groot en toenemend probleem, met hoge mortaliteit- & morbiditeitgraad en enorme ziektekosten. Atriumfibrilleren (of boezemfibrilleren) komt bijvoorbeeld voor in 2-3% van de populatie, voornamelijk in de populatie van 65 jaar en ouder, waarvan spoedig 1 op de 5 deze hartritmestoornis zal hebben. Ook het aantal patiënten met ventrikelfibrilleren (kamerfibrilleren) is enorm: plotselinge hartdood als gevolg van kamerfibrilleren of een hartstilstand is goed voor  $\pm 18\%$  van alle sterfgevallen in de Westerse wereld. Naast sterfte, dragen deze stoornissen ook bij aan de verdere verslechtering van het hart, doordat de perfusie van de hartspier tijdens de ritmestoornis ernstig wordt belemmerd en het weefsel dus niet kan worden voorzien van voldoende zuurstof. Als gevolg van de incidentie en ernst van deze stoornissen wordt alleen al in Europa jaarlijks meer dan €170 miljard uitgegeven aan cardiovasculaire aandoeningen, waarvan een significant deel aan bovengenoemde hartritmestoornissen. Gezien de toenemende leeftijdsverwachting en vergrijzing wordt verwacht dat deze aantallen in de nabije toekomst scherp toenemen. Daar genterapie kans biedt op genezing zal succesvolle toepassing van deze vorm van therapie een significante bijdrage leveren aan de mortaliteit en kwaliteit van leven van patiënten met hartritmestoornissen.

Maatschappelijk belang: Patiënten met hartritmestoornissen hebben veelal levenslange medicamenteuze behandelingen nodig, met als enig alternatief bijzonder kostbare medische interventies als operatieve ablatie of implantatie van een pacemaker of implanteerbare defibrillator. Aangezien bijna alle vormen van anti-aritmische therapie levenslang nodig zijn, zullen de kosten - met het oog op de vergrijzing - alleen maar verder toenemen. Dit maakt dat hartritmestoornissen een grote en langdurende nadelige impact op de maatschappij heeft. Daarnaast is het van belang om aan te geven dat de consequenties van deze stoornissen, ondanks behandeling, een significante invloed kan hebben op de gezondheid van de patiënten, zoals herseninfarcten en sterk verminderde lichamelijke conditie. Tenslotte zijn er een tal van ernstige bijwerkingen van de medicamenteuze therapie van ritmestoornissen die een nieuwe behandeling zonder deze bijwerkingen noodzakelijk maakt. Nieuwe behandelingsmogelijkheden die mogelijk maken dat hartritmestoornissen daadwerkelijk in de kern kunnen worden aangepakt, zoals bij genterapie, kunnen dus ook een bijzonder grote positieve impact hebben op de maatschappij, en niet alleen in Nederland, maar wereldwijd.

Wetenschappelijk belang:

Ons begrip van hartritmestoornissen is relatief beperkt. Dit project richt zich op de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten van hartritmestoornissen *in vitro* en de ontwikkeling van gerichte genetische interventies die de ritmestoornis tegengaat. Bij het behalen van deze doelstelling draagt dit project bij aan het wetenschappelijk inzicht van hartritmestoornissen maar tevens ook aan de behandeling daarvan. De wetenschappelijke bijdrage van dit project kan daarmee een goede basis vormen voor toekomstig *in*

*vivo* onderzoek gericht op genetische interventies tegen hartritmestoornissen.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Om antwoord te geven op de vraag hoe de elektrische eigenschappen van atriale en ventriculaire hartspiercellen, in een setting van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, door middel van genetische interventie positief kunnen worden aangepast teneinde de uiting van ritmestoornissen te kunnen voorkomen, remmen of termineren zijn de volgende 2 onderdelen opgezet:

**(i)** Het karakteriseren van ziektemodellen.

Met hartspiercellen geïsoleerd uit neonatale ratten pups kan *in vitro* i) hypertrofie (door toevoeging van fenylefrine), ii) verbindweefseling (door hartspiercellen te kweken met bindweefselcellen) en iii) oxidatieve stress (door een eiwit tot expressie te brengen dat onder invloed van licht vrije zuurstof radicalen produceert via genetische modificatie) worden nagebootst met als gevolg dat het ritme van deze hartspiercellen verstoord raakt. Om therapeutische aangrijpingspunten voor deze aritmieën te identificeren is het nodig om deze ziektemodellen in detail te onderzoeken middels verschillende elektrofysiologische (whole-cell patch clamp, multi-electrode mapping en optical voltage en calcium mapping) en biochemische (polymerase chain reaction [PCR], Western blot, immuno- and chemocytologie, flowcytometrie, transcriptoom en proteoom analyses) technieken, waarbij wij ons in het bijzonder richten op de volgende eiwitgroepen; *ion kanalen* (omdat deze eiwitten aan de basis staan van de elektrofysiologie in de hartcel), *connexines* (omdat deze koppelingseiwitten communicatie tussen hartcellen mogelijk maakt), *groei- en proliferatiefactoren* (omdat deze eiwitten essentieel zijn in het onderhouden van gezond hartweefsel) en  $Ca^{2+}$  huishouding (omdat deze eiwitten de intracellulaire concentratie  $Ca^{2+}$  reguleren en daarmee bijdragen aan optimale hartfunctie). Wij richten ons primair op deze eiwitten omdat hiervan bekend is dat deze een belangrijke rol spelen in het elektrisch functioneren van hartweefsel. Naast de identificatie/modificatie benadering zullen de verstoorde elektrofysiologische processen ook op directe wijze worden gemoduleerd door gebruik te maken van lichtgevoelige eiwitten (o.a. ion kanalen). Deze technologie wordt *optogenetics* genoemd en maakt het mogelijk om biologische processen, inclusief elektrofysiologische processen, op precieze wijze te controleren door de expressie en activatie van deze licht-gevoelige eiwitten. Wij hebben reeds ervaring met de hierboven genoemde modellen, maar een uitgebreider mechanisch inzicht op cellulair niveau is essentieel om potentiële therapeutische aangrijpingspunten voor genterapie te kunnen ontdekken.

**(ii)** Het testen en evalueren van genetische interventies ten behoeve van het voorkomen en termineren van hartritmestoornissen.

Nadat de verschillende *in vitro* modellen in detail zijn gekarakteriseerd zullen associaties worden onderzocht tussen veranderingen op moleculair/cellulair niveau en de afwijkingen op elektrofysiologisch gebied. Na het rangschikken op sterkte van associatie zullen verschillende genetische interventies worden ontwikkeld voor een specifieke factor, waarbij wij ons in beginsel richten op de eerder genoemde ion kanalen, connexines, groei- en proliferatiefactoren en de  $Ca^{2+}$  huishouding. Bij de identificatie van zo'n potentieel therapeutisch aangrijpingspunt zal middels genetische interventies worden getracht deze dusdanig te modifieren, zowel in functionaliteit als expressieniveau, om het causale verband tussen de specifieke factor en de elektrofysiologische afwijkingen te onderzoeken. De genetische interventies zullen plaatsvinden door het gebruik van virale (lenti, retro, adeno, adeno-geassocieerde) en niet-virale (plasmide) vectoren afhankelijk van de aard van de factor die wordt geïdentificeerd. Genetische interventies met een significant corrigerend effect en hoog therapeutisch potentieel en laag risico op bijwerkingen zullen in aanmerking komen voor toekomstige vervolgentoelagen.

Naast deze factor-specifieke benadering zullen de verstoorde elektrofysiologische processen ook door het gebruik van lichtgevoelige eiwitten worden gemodificeerd. Nadat deze eiwitten tot expressie zijn gebracht zullen de vervolgens worden geactiveerd met licht, waardoor op exacte wijze kan worden bepaald waar, op welke moment en met welke intensiteit, voor hoe lang een bepaald elektrofysiologisch proces wordt gecontroleerd (bijvoorbeeld de membraanspanning van de hartspiercellen). De invloed van deze optogenetische interventies in de 3 verschillende modellen wordt met dezelfde technieken in kaart



gebracht. Door de elektrofysiologische processen te beïnvloeden middels zowel factor-specifieke als proces-specifieke interventies zal een dieper mechanistisch inzicht worden verkregen en kan tevens worden vastgesteld welke genetische interventie het meest effectief is in het verminderen van de ritmestoornissen.

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

De hoofdlijnen van het project zijn:

- (i) Het onderzoeken van *in vitro* ziektemodellen waarvan bekend is dat deze leiden tot hartritmestoornissen. Hierbij gaat het om hypertrofie van hartspiercellen, fibrose van de hartspiercelkweek en het induceren van oxidatieve stress in kweken van atriale en ventriculaire hartspiercellen. Om deze modellen te kunnen produceren zijn cellen nodig, zoals eerder beschreven wordt hiervoor gebruik gemaakt van neonatale rattenpups. We gebruiken rattenpups van twee dagen oud, omdat de hartspiercellen van deze pups resulteren in een hoge kwaliteit van celkweken en ook het langst in kweek te houden zijn. De neonatale ratten pups zullen, voorafgaand aan adequate volledige anesthesie en de daarop volgende decapitatie en excisie van de harten, geen aanvullende behandeling/interventie ondergaan.
- (ii) Het testen van genetische interventies ten behoeve van het voorkomen en termineren van hartritmestoornissen. Deze genetische interventies zullen getest worden op de pro-aritmische ziektemodellen die hierboven beschreven zijn. Genetische interventies vinden enkel *in vitro* plaats. NB: Bij de productie van vectoren die leiden tot genetische modificaties wordt geen gebruik gemaakt van proefdieren.

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.

Om het aantal dieren tot een minimum te beperken zullen eerst aangrijpingspunten in de ziektemodellen worden geïdentificeerd, zodat de kans aanzienlijk groter is dat er een (positief) effect op het ritme van de hartspiercellen kan worden vastgesteld. Vervolgens zal de specifieke rol van deze aangrijpingspunten of factoren in de ritmestoornissen worden onderzocht middels genetische interventies. De mijlpalen hierbij zijn: a) het karakteriseren van de ritmestoornis en het onderliggende moleculaire en cellulaire substraat in de 3 ziektemodellen, om b) hieruit vervolgens aangrijpingspunten te identificeren, deze te prioriteren en de hierop van toepassing zijnde genetische interventies te ontwikkelen, waarna ten slotte c) wordt bestudeerd in welke mate en hoe deze interventies de ritmestoornissen weten te voorkomen dan wel te termineren. Wanneer in fase i van een van de ziektemodellen geen sterke aangrijpingspunten gevonden worden zal fase ii van dat ziektemodel niet doorgaan.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Excisie van neonatale ratten harten uit gezonde twee dagen oude neonatale ratten pups na decapitatie onder volledige anesthesie en afwezigheid pijnreflex.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11600				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Excisie van neonatale ratten harten</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Excisie van neonatale ratten harten
Volgnummer	Type dierproef				
1	Excisie van neonatale ratten harten				

*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.

Er wordt gebruik gemaakt van twee dagen oude ratten pups. De harten van deze pups worden direct na adequate anesthesie en decapitatie uitgenomen. Uit deze neonatale ratten harten worden spiercellen (cardiomyocyten) uit zowel de atria als ventrikels geïsoleerd. Uit uitgebreid onderzoek van onze onderzoeksgroep en groepen wereldwijd is gebleken dat het gebruik van neonatale ratten harten hartspiercellen oplevert die tot 2 weken lang in kweek gehouden kunnen worden zonder verlies van fenotype en dusdanig robuust zijn dat de geplande interventies plaats kunnen vinden. Primaire uitkomstparameter: isolatie en in kweek houden van levende cardiomyocyten afkomstig uit neonatale ratten pups.

Na het isoleren van de hartspiercellen worden deze uitgeplaat in petrischalen met een doorsnede van 15 mm. In deze kweken is 80% van de cellen hartspiercel en 20% fibroblast. Deze cellen worden 12 uur na uitplaten behandeld met een cytostaticum (mitomycine-c) om overgroeiing door fibroblasten te voorkomen. De kweken worden vervolgens i) blootgesteld aan stimuli om de kweken hypertroof te maken, ii) voorzien van additionele fibroblasten (om de kweken fibrotisch te maken), of iii) getransduceerd met lentivirale vectoren om eiwitten tot expressie te brengen die onder invloed van licht vrije zuurstof radicalen gaan produceren (om oxidatieve stress te veroorzaken). Als controles worden kweken gebruikt met medium zonder deze specifieke reagentia of met "lege" lentivirale vectoren. Na 4-9 dagen maturatie van de kweek bestuderen wij A) hoe en in welke mate de verschillende protocollen hebben bijgedragen aan elektrofysiologische veranderingen en daarmee hebben geleid tot ritmestoornissen in de celkweken. Om vervolgens B) te onderzoeken welke moleculaire en cellulaire factoren hieraan ten grondslag liggen, waarna C) specifieke genetische interventies worden ontwikkeld om deze factoren te kunnen modificeren middels down- of upregulatie van de desbetreffende eiwitten. Naast deze factor-specifieke benadering om een beter inzicht te krijgen in de onderliggende pro-arrhythmische mechanismen en te bepalen welke genetische

modificatie welk therapeutisch potentieel heeft, zullen ook D) specifieke elektrofysiologische processen op directe wijze worden gemoduleerd door gebruikt te maken van lichtgevoelige eiwitten (optogenetics). Het zal hier in het bijzonder gaan om lichtgevoelige ion kanalen, waarmee bijvoorbeeld het membraan van de cellen zowel kan worden gedepolariseerd (minder negatief voltage) als gehyperpolariseerd (meer negatief). Deze aanpak stelt ons in staat om op precieze wijze de elektrofysiologie van de celweek in zowel tijd als ruimte te controleren om daarmee eveneens het ontstaan en de terminatie van ritmestoornissen te onderzoeken ten einde de genterapeutische interventies te testen op hun therapeutisch potentieel. Het in kaart brengen van de effecten zal plaatsvinden conform de eerder beschreven experimenten.

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

De moederdieren zullen drie weken zwanger zijn. Wanneer er vervolgens een nest geboren wordt, zullen 2 pups bij de moeder achterblijven om de lactatie in gang te houden en de kans op mastitis te verkleinen. Deze pups en de moeders blijven dus in leven. De overige pups worden gebruikt voor het experiment.

De pups worden verdoofd door middel van isofluraan. Door het controleren van de voetreflex wordt de verdoving geverifieerd. Vervolgens worden de pups gedood middels decapitatie, waarna de kopjes direct in de vloeibare stikstof worden geplaatst. Vervolgens wordt de thorax opengeknipt waarna het hart wordt uitgenomen. In totaal duurt deze procedure 5 minuten.

Deze aanpak laat toe dat het hart pijnloos, snel en doeltreffend kan worden uitgenomen met maximale levensvatbaarheid van de hartspiercellen die vervolgens uit het hart geïsoleerd zullen worden voor onderzoek.

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

De experimenten worden uitgevoerd in 24-wells platen met een doorsnede van 15 mm per well. Deze wells hebben het kleinste formaat waarbij elektrofysiologische eigenschappen van de cellen inclusief het optreden van ritmestoornissen bestudeerd kan worden. Aangezien voor de opzet van dit onderzoek een confluerende (aaneengesloten) monolaag vereist is, zodat geleiding en ritmestoornissen kunnen worden onderzocht, is een celdichtheid van 800.000 cellen/well noodzakelijk. Lagere celdichtheden zorgen voor structurele inhomogeniteit hetgeen de normale geleiding van de elektrische signalen verslechtert. Deze celdichtheid is gebaseerd op uitvoerige testen en is tevens nodig om voldoende fluorescent signaal te verkrijgen bij de optical mapping experimenten, zodat betrouwbare metingen kunnen worden uitgevoerd. Voor moleculaire en cellulaire analyses - bijvoorbeeld Western blotting, PCR, kleuringen - die parallel aan de optical mapping experimenten dienen te worden uitgevoerd, worden respectievelijk 0,8 , 0,5 , en 0,1 miljoen cellen per well gebruikt. Per neonataal rattenhartje worden gemiddeld zo'n 3 miljoen ventriculaire hartspiercellen en 0,5 miljoen atriale cardiomyocyten geïsoleerd. Door zowel ventriculaire als atriale cellen uit hetzelfde hartje te isoleren wordt deze optimaal gebruikt. Tijdens de isolatieprocedure worden ook de bindweefselcellen uit de hartjes geïsoleerd. Zodoende hoeven er, wanneer er voor het fibrosemodel bindweefselcellen nodig, geen extra proefdieren te worden gebruikt.

## **B. De dieren**

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

Diersoort: Rat, Wistar.

Er is voor neonatale Wistar pups gekozen omdat i) wij gebruik maken van volwassen Wistar ratten voor onze *in vivo* experimenten (geen onderdeel van deze aanvraag, beschreven in DEC14115 + DEC12095) en daarmee de bevindingen van het *in vitro* onderzoek later makkelijk vertaald kunnen worden naar eventueel *in vivo* onderzoek en ii) deze ratten binnen het proefdiercentrum van de instellingsvergunninghouder gefokt worden en daarmee vraag en aanbod voor de experimenten op elkaar afgestemd kan worden.

Herkomst: fok van instellingsvergunninghouder.

Levensstadia en geslacht:

- Adult: vrouwelijke moederdieren. Deze dieren zullen niet worden gedood.
- Pups: 2 dagen oud, zowel mannetjes als vrouwtjes. Voor de vervolgentoetsen zijn hartcellen nodig die twee weken in kweek kunnen worden gebracht met behoud van functionele en structurele eigenschappen. Dit kan alleen maar worden bereikt met cellen uit neonatale ratten harten,

aangezien hartspiercellen geïsoleerd uit adulte dieren *in vitro* maar ongeveer 2 dagen blijven leven.

Geschatte aantallen:

De geschatte nestgrootte is 10 pups. Aangezien er twee pups bij de moeder achterblijven gaan wij uit van 8 pups per moederdier die voor de vervolggexperimenten gebruikt kunnen worden. Zoals eerder aangegeven worden per neonataal rattenhartje gemiddeld zo'n 3 miljoen ventriculaire hartspiercellen en 0,5 miljoen atriale cardiomyocyten geïsoleerd.

Om de 3 verschillende ziektemodellen met controles te onderzoeken wordt er, zoals eerder beschreven, A) elektrofysiologisch (optical mapping) en B) moleculair en cellulair (Westernblot, PCR en immunokleuringen) onderzoek verricht om zo aangrijpingspunten voor genterapeutische interventies te identificeren. Dit onderzoek zal het eerste jaar in beslag nemen, omdat wij uit ervaring weten dat binnen 1 jaar voldoende inzicht kan worden verkregen om targets te identificeren voor vervolgonderzoek als de isolaties 40 keer per jaar plaatsvinden met de hieronder beschreven hoeveelheden cellen. Per isolatieronde gebruiken we voor de optical mapping experimenten en Western blot (waarbij dezelfde cellen worden gebruikt) 1,5 x 24-wells platen met 0,8 miljoen cellen per well, voor PCR 0,5 x 24-well plaat met 0.5 miljoen cellen per well, voor kleuringen 0,5 x 24-well plaat met 0,1 miljoen cellen per well. Dit betekent dat per week  $1,5 \times 24 \times 0,8 + 0,5 \times 24 \times 0,5 + 0,5 \times 24 \times 0,1 = 36$  miljoen ventriculaire hartspiercellen nodig zijn. Hiervoor gebruiken wij 36 miljoen / 3 miljoen cellen per hartje = 12 neonatale rattenpups. Dit maakt dat wij  $36 \times 0,5 = 18$  miljoen atriale hartspiercellen kunnen gebruiken voor het onderzoek naar boezemfibrilleren. Voor deze experimenten (A en B) wordt dezelfde ratio als voor de ventriculaire cellen aangehouden en dit geldt voor alle hieronder beschreven experimenten. Dit betekent dat voor de 3 groepen (hypertrofie, fibrosis en oxidatieve stress),  $3 \times 12 = 36$  pups per week nodig zijn en dus  $36 \times 40$  weken = 1440 neonatale rattenpups. Aan de hand van ervaring verwachten wij in dit jaar 6 aangrijpingspunten per ziektemodel te vinden.

C) Nadat de aangrijpingspunten in de hierboven beschreven studies zijn geïdentificeerd (geschat op 18 in totaal), zullen deze gedurende de volgende 2 jaar op systematische wijze worden onderzocht middels genetische interventies. Ervaring heeft ons geleerd dat om de therapeutische relevantie van 1 target te onderzoeken wij de volgende hoeveelheden cellen 40 maal per jaar nodig hebben; voor de optical mapping experimenten en Western blot 0,50 x 24-wells platen met 0,8 miljoen cellen per well, voor PCR 0,16 x 24-well plaat met 0.5 miljoen cellen per well, voor kleuringen 0,16 x 24-well plaat met 0,1 miljoen cellen per well. Dit betekent dat per week  $0,50 \times 24 \times 0,8 + 0,16 \times 24 \times 0,5 + 0,16 \times 24 \times 0,1 = 12$  miljoen ventriculaire hartspiercellen nodig zijn. Hiervoor gebruiken wij  $12/3 = 4$  neonatale rattenpups. Dat maakt  $4 \times 40$  weken = 160 pups per target x 6 targets x 3 ziektemodellen = 2880 neonatale rattenpups.

In de laatste fase D) zal middels optogenetische interventies de functionaliteit van de meest veelbelovende targets op precieze wijze worden onderzocht, zodat dieper mechanistische inzicht kan worden verkregen. Wij verwachten 2 targets over te houden per ziektemodel, dus 6 in totaal. Ervaring leert ons wij voor deze experimenten ongeveer 1 jaar nodig te hebben om duidelijk inzicht te krijgen, waarbij 40 maal per jaar de cellen beschikbaar zijn voor de volgende onderzoeken; voor de optical mapping experimenten en Western blot 0,75 x 24-wells platen met 0,8 miljoen cellen per well, voor PCR 0,24 x 24-well plaat met 0.5 miljoen cellen per well, voor kleuringen 0,24 x 24-well plaat met 0,1 miljoen cellen per well. Dit betekent dat per week  $0,75 \times 24 \times 0,8 + 0,24 \times 24 \times 0,5 + 0,24 \times 24 \times 0,1 = 18$  miljoen ventriculaire hartspiercellen nodig zijn. Hiervoor gebruiken wij  $18/3 = 6$  neonatale rattenpups. Dat maakt  $6 \times 40$  weken = 240 pups per target x 6 targets = 1440 neonatale rattenpups.

Uiteindelijk maakt dit dat in totaal; 1440 pups (A-B; 1 jaar) + 2880 pups (C; 2 jaar) + 1440 pups (D; 1 jaar) = 5760 2-dagen oude neonatale pups nodig zijn om de doelstelling te behalen. Het betreft hier een groot project dat een belangrijke basis vormt voor het pre-klinisch onderzoek naar hartritmestoornissen in het LUMC.

### 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:

Recentelijk zijn hartspiercellen afgeleid van humane embryonale stamcellen en humane geïnduceerde pluripotente stamcellen naar voren gekomen als nieuw modelsysteem voor het studeren van hartziekten. Wegens de ethische bezwaren tegen het gebruik van embryonale stamcellen wordt op dit moment gefocust op de geïnduceerde stamcellen. Ondanks het grote potentieel, hebben deze cellijnen ook serieuze nadelen waardoor ze nog niet geschikt zijn als alternatief voor de in deze aanvraag beschreven dierproeven. Ten eerste is het differentiëren van de pluripotente stamcellen naar hartspiercellen niet erg efficiënt en leidt dit tot heterogene populaties. Daarnaast gaat alle epigenetische informatie tijdens het proces verloren, welke juist invloed kan hebben op het ontstaan van cardiovasculaire ziekten. Tevens is het genereren van pluripotente stamcellen, laat staan een enigszins homogene populatie hartspiercellen hieruit, erg tijdrovend en duur proces, aangezien o.a. instabiele groeifactoren moeten toegevoegd op specifieke tijdstippen. Wanneer deze nadelen overkomen kunnen worden of er anderszins gegenereerde cellijnen beschikbaar komen die (elektro)fysiologisch goed vergelijkbaar zijn met primaire hartspiercellen, zullen wij uiteraard hierop overstappen.

Daarnaast is ons laboratorium enkele jaren geleden een samenwerking aangegaan met de [REDACTED]. In samenwerking met [REDACTED] wordt gewerkt aan verdere verbetering van *in silico* modellen (computermodellen voor simulaties) van het hartspiercellen en het hele hart. Deze *in silico* modellen worden gebruikt om resultaten voor de *in vitro* en *in vivo* experimenten te voorspellen, waarmee proefdieren worden vervangen. Tevens is met [REDACTED] gewerkt aan een verbetering van de analyse van de verkregen data, waardoor de hoeveelheid gegevens per onderzochte well groter en waardevoller wordt.

##### Vermindering:

Ter vermindering maken wij zo optimaal mogelijk gebruik van ieder hartje. Zowel de boezems als kamers worden gebruikt en ook de fibroblasten (bindweefselcellen) worden in kweek gehouden voor onderzoek. Ook eventuele referentieorganen voor eiwit- of genexpressie analyse wordt uit dezelfde neonatale ratjes gehaald. Zoals hierboven aangegeven houden wij ons intensief bezig met computersimulaties om zo proefdieren te vervangen. Deze simulaties zorgen echter ook voor een vermindering van het aantal proefdieren dat nodig is om een onderzoeksvraag te beantwoorden, omdat middels deze simulaties kan worden voorspeld welke *in vitro* experimenten bijdragen aan de beantwoording van de hoofddoelstelling ([REDACTED])). Experimenten waarvan aangenomen kan worden dat deze hier niet aan bijdragen zullen dus bij voorkeur niet worden uitgevoerd.

##### Verfijning:

Na de bevalling blijven 2 pups per nest bij de moeder, zodat de kans op stuwings bij de moeder wordt verkleind. Hiermee wordt de stress van de moeder en de kans op mastitis (als gevolg van stuwings) verlaagd. De pups die voor de experimenten worden gebruikt worden volledig verdoofd voordat het hart uitgehaald wordt, hier zullen zij dus geen pijn aan ondervinden. Daarnaast controleren dierversorgers dagelijks op ongerief.

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.

Voor de moederdieren wordt angst en pijn tot een minimum beperkt door 2 pups per nest bij de moeder te laten. Hierdoor ondervindt zij minder stress van het wegnemen van de overige pups en wordt het risico op stuwings en mastitis beperkt.

De pups worden onder volledige anesthesie en middels decapitatie geofferd. De anesthesie wordt voorafgaand eerst gecontroleerd middels een pijnprikkel.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

---

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

---

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

---

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

---

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

---

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

De pups worden eerst volledig verdoofd met isofluraan, waarna decapitatie plaatsvindt om vervolgens het hart uit te nemen. De moederdieren hebben geen pijnbestrijding nodig.

---

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

---

**In overleg met de IvD is vastgesteld dat er geen ongerief wordt voorzien bij de moederdieren omdat de pups snel postpartum worden meegenomen. De lactatie is dan nog niet volledig op gang en de twee pups die achterblijven in het nest moeten voldoende zijn om de moeder te ontlasten van stuwning.**

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

**Niet van toepassing.**

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

Na de bevalling blijven 2 pups per nest bij de moeder zodat zij minder stress ervaart en het risico op stuwning wordt vermindert. Daarnaast controleren dierversorgers dagelijks op ongerief.

**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.

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

**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.

**Licht ongerief.**

**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.

Voor de proeven moeten primaire hartcellen worden geïsoleerd uit het neonatale rattenhart. Daartoe moet het hart worden uitgenomen. **De neonatale ratten worden voor uitname van het hart gedecapiteerd. Er wordt gekozen voor decapitatie omdat inerte gassen als N2 en argon niet op het LUMC proefdiercentrum aanwezig zijn en CO2 asfyxie niet op neonaten toepasbaar is wegens hun ongevoeligheid voor hypoxie. Tevens is een overdosis anesthesie bij de neonatale pups niet gewenst omdat dit de kwaliteit van het hartweefsel negatief kan beïnvloeden.**

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 Ziekenhuis Leiden  
Leids Universitair Medisch Centrum

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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  
AVD116002017818

**Bijlagen**

2

Datum 23 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 februari 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002017818. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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



**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

23 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD116002017818

**Datum:**  
23 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD116002017818

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600  
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Mevr. Leids Universitair Medisch Centrum [REDACTED]  
KvK-nummer: 27366422  
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2  
Postbus: 9600  
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN  
IBAN: NL11DEUT0451001400  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: LUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
23 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD116002017818

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2017

Geplande einddatum: 28 februari 2021

Titel project: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.

Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar genetische interventies voor hartritmestoornissen in celkweekmodellen.

Naam DEC: DEC Leiden

Postadres DEC: [REDACTED] LUMC Postbus 9600 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 568,-

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: Leiden  
Datum: 20 februari 2017

**Datum:**  
23 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD116002017818

[Redacted]

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 27 februari 2017 15:55  
**Aan:** [Redacted]  
**Onderwerp:** vragen aan aanvrager bij AVD116002017818

Geachte leden van DEC lumc,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning gedaan waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Onderstaande vragen zijn nog aan de aanvrager voorgelegd. Wanneer u hierover aanvullend wilt adviseren dan horen wij dat graag,

Vriendelijke groet [Redacted]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend waar bij de behandeling nog een paar vragen zijn. Het betreft uw project AVD116002017818: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.

U beschrijft het ongerief als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen, in dit geval het hart, verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen?  
U beschrijft in de bijlage dierproeven onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden, wanneer dit het geval is, dan zijn de moederdieren onderdeel van dit projectvoorstel en moet u het aantal dieren opnemen onder B. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?

Uit het advies van de DEC volgt dat u de rattenpups dood door middel van decapitatie, waarna de kop in stikstof wordt gedompeld. Hoewel decapitatie als dodingsmethode is opgenomen in bijlage IV van de richtlijn , mag dit slechts toegepast worden wanneer is onderbouwd dat andere methoden niet geschikt zijn. Kunt u deze onderbouwing nog toevoegen onder punt L. in de bijlage dierproeven?

Kunt u in de NTS onder 3.6 de zin 'de dieren zullen overlijden onder narcose' herformuleren naar 'de dieren worden gedood onder narcose' ?

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

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

Geachte mevrouw ██████,

Recent hebben wij een aanvraag tot projectvergunning (*project AVD116002017818: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies*) bij de CCD ingediend.

Hartelijk dank dat onze aanvraag in behandeling is genomen. U heeft ons vorige week per e-mail geschreven dat de CCD een aantal vragen had alvorens de projectvergunning aanvraag besproken kan worden. In deze brief vind u het commentaar van de CCD voorzien van ons antwoord:

---

**Opmerking 1:**

*“U beschrijft het ongerief als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen, in dit geval het hart, verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen?”*

**Antwoord 1:**

De classificering van het ongerief in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting is gewijzigd van “terminaal” naar “licht ongerief”.

**Opmerking 2:**

*“U beschrijft in de bijlage dierproeven onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden, wanneer dit het geval is, dan zijn de moederdieren onderdeel van dit projectvoorstel en moet u het aantal dieren opnemen onder B. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?”*

**Antwoord 2:**

In het overleg met de IvD is vastgesteld dat de moederdieren geen ongerief ondervinden omdat de pups snel postpartum worden meegenomen. De lactatie is dan nog niet volledig op gang en de twee pups die in het nest achterblijven moeten voldoende zijn om de moeder te ontlasten van stuwning. Dit heeft tot gevolg dat het moederdier geen proefdier is zoals bedoeld in de Wod maar een fokdier.

**Opmerking 3:**

*“Uit het advies van de DEC volgt dat u de rattenpups dood door middel van decapitatie, waarna de kop in stikstof wordt gedompeld. Hoewel decapitatie als dodingsmethode is opgenomen in bijlage IV van de richtlijn, mag dit slechts toegepast worden wanneer is onderbouwd dat andere methoden niet geschikt zijn. Kunt u deze onderbouwing nog toevoegen onder punt L. in de bijlage dierproeven?”*

**Antwoord 3:**

Wij kiezen er voor om de neonatale pups onder anesthesie te doden door middel van decapitatie omdat inerte gassen als N<sub>2</sub> of argon niet voorradig zijn op het proefdiercentrum van het LUMC en CO<sub>2</sub> asfyxie niet toepasbaar is op neonaten wegens hun ongevoeligheid voor hypoxie. Tevens is een overdosis anesthesie bij de neonatale pups niet gewenst omdat dit de kwaliteit van het hartweefsel negatief kan beïnvloeden. De onderbouwing is toegevoegd onder punt L. in de bijlage dierproeven.

**Opmerking 4:**

*“Kunt u in de NTS onder 3.6 de zin ‘de dieren zullen overlijden onder narcose’ herformuleren naar ‘de dieren worden gedood onder narcose’?”*

**Antwoord 4:**

De zin in de NTS onder 3.6 is geherformuleerd.

**Opmerking 5:**

*“Ter aanvulling op mijn eerder gestelde vragen, hebben wij ook gezien dat in de Niet Technische Samenvatting het LUMC genoemd staat. Dit is geen bezwaar, maar maakt de NTS niet meer anoniem, daarom wil ik dat hierbij onder de aandacht brengen.”*

**Antwoord 5:**

Dank voor de observatie, wij hebben de Niet Technische Samenvatting geanonimiseerd.

---

In de bijlage vindt u de aangepaste formulieren van de projectvergunning aanvraag. De wijzigingen zijn aan de hand van bovenstaand commentaar in het rood doorgevoerd.

Wij hopen dat onze aanvraag verder in behandeling kan worden genomen. Mochten er nog aanvullende vragen of opmerkingen zijn horen wij dit uiteraard graag.

Met vriendelijke groet,  
namens alle andere betrokkenen,

[Redacted]

[Redacted]

Leids Universitair Medisch Centrum

## Format DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002017818
2. Titel van het project: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar genetische interventies voor hartritmestoornissen in celkweekmodellen.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: DEC Leiden
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 11-01-2017
  - aanvraag compleet: 12-01-2017
  - in vergadering besproken: 19-01-2017
  - anderszins behandeld: aanvullende informatie is via e-mail ronde besproken.
  - termijnonderbreking(en) van / tot: 26-01-2017 t/m 31-01-2017
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 31-01-2017
  - advies aan CCD: 17-02-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.
8. Eventueel horen van aanvrager
  - N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 26-01-2017
  - De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de titel, de euthanasie van de rattenpups en de vermindering in verband met het samenwerkingsverband.
  - Datum antwoord: 31-01-2017  
Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlage en de NTS door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
  - N.v.t.



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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

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

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat en kan getypeerd worden als een project. De voorgestelde dierexperimenten zijn, naar inziens van de DEC, logisch en nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt en bevatten geen onzekerheden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van dit project is onderzoeken hoe de veranderingen in elektrische eigenschappen van hartspiercellen (zowel atriale als ventriculaire), als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, door middel van genetische interventies dusdanig kunnen worden aangepast zodat hiermee een positief effect (d.w.z. beëindigen/voorkomen) op hartritmestoornissen kan worden bewerkstelligd. Met als uiteindelijke doel meer wetenschappelijk inzicht verkrijgen in de pathogenese van hartritmestoornissen en in de potentie van genetische interventie als causale behandeling.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en dat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat ondanks dat er door onderzoek meer bekend is over het ontstaan en de mechanismen achter hartritmestoornissen, deze kennis nog verre van volledig is. Mede door de tekortkomingen aan inzicht is de huidige behandeling van hartritmestoornissen relatief aspecifiek en beperkt, daar het alleen symptomen bestrijdt. Door de zeer specifieke benadering van gentherapie neemt de effectiviteit van de behandeling wellicht toe, terwijl met deze therapie het risico op bijwerkingen en complicaties significant zou kunnen afnemen. Door mogelijk herstel van de normale werking van de hartspiercel, biedt gentherapie zelfs kans op genezing.

De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten van hartritmestoornissen *in vitro* en de ontwikkeling van gerichte genetische interventies die de ritmestoornis tegengaat, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de patiënt en de samenleving.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal

worden aangetast. De rattenpups zullen gedood worden voor het verkrijgen van weefsel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten en hun lichamelijke conditie zal verbeterd worden. Daar gentherapie kans biedt op genezing zal succesvolle toepassing van deze vorm van therapie een significante bijdrage leveren aan de mortaliteit en kwaliteit van leven van patiënten met hartritmestoornissen.

Waarden die voor de samenleving bevorderd worden: Nieuwe behandelingsmogelijkheden die hartritmestoornissen in de kern aanpakken kunnen wereldwijd een grote positieve impact hebben op de maatschappij door het afnemen van de mortaliteit- & morbiditeitsgraad en enorme ziektekosten.

6. Er worden in de aanvraag geen nadelige effecten op het milieu beschreven. Er is geen aanleiding voor de DEC om dit in twijfel te trekken.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft ruime ervaring met zowel het gebruik van cellen uit het neonatale ratten hart als de gen therapeutische technieken en read-out systemen beschreven in dit projectvoorstel. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijk resultaten behaald resulterend in een groot aantal publicaties in gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften, proefschriften en subsidies.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstelling en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De rattenpups worden, zonder voorafgaande handelingen, onder anesthesie gedood. Dit wordt als geclassificeerd als "terminaal". De inschatting van de DEC is in overeenstemming met het niveau van ongerief geschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van de dieren zal worden aangetast. Gedurende het project worden de rattenpups gedood voor het verkrijgen van weefsel.
13. Gezien de rattenpups zonder voorafgaande handelingen gedood worden, wordt niet verwacht dat zich omstandigheden voor zullen doen waarbij het toepassen van humane eindpunten nodig is om verder lijden van de dieren te voorkomen.

*3V's*

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Zo wordt er gebruik gemaakt van *in silico* modellen om resultaten voor de *in vitro* en *in vivo* experimenten te voorspellen, waarmee proefdieren worden vervangen. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met dit soort experimenten. Bovendien beschikt de onderzoeksgroep over een team van biotechnici die de benodigde ervaring hebben met proefdieronderzoek. Zowel de boezems als kamers worden gebruikt en ook de fibroblasten worden in kweek gehouden voor onderzoek. Ook eventuele referentieorganen voor eiwit- of genexpressie analyse wordt uit dezelfde neonatale ratjes gehaald. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door de rattenpups onder anesthesie worden gedood middels decapitatie, waarna de kopjes direct in de vloeibare stikstof worden geplaatst. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Voor de experimenten wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke rattenpups.
19. De rattenpups worden gedood in kader van het project. Na het doden van de dieren worden de hartjes uitgenomen om hier vervolgens hartspiercellen uit te isoleren voor *in vitro* onderzoek. Er wordt een voor neonatale rattenpups passende dodingsmethode gebruikt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

*NTS*

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

## D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het onderzoek naar veranderingen in elektrische eigenschappen van hartspiercellen welke door middel van genetische interventies dusdanig kunnen worden aangepast dat hiermee een positief effect op hartritmestoornissen kan worden bewerkstelligd, met als uiteindelijke doel meer wetenschappelijk inzicht verkrijgen in hartritmestoornissen maar tevens ook in de behandeling daarvan, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten van hartritmestoornissen *in vitro* en de ontwikkeling van gerichte genetische interventies die de ritmestoornis tegengaat.  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: gering nadeel.  
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.  
Waarden die voor de doelgroep (incl. de maatschappij) bevorderd worden: groot voordeel.  
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Verschillende pathofysiologische veranderingen aan het hart kunnen leiden tot (dodelijke) hartritmestoornissen. Deze hartritmestoornissen zijn een groot en groeiend, wereldwijd probleem op zowel klinisch, wetenschappelijk als economisch vlak. Ondanks dat er door onderzoek meer bekend is over het ontstaan en de mechanismen achter hartritmestoornissen is de kennis nog verre van volledig. Mede door de tekortkomingen aan inzicht is de huidige behandeling van hartritmestoornissen relatief aspecifiek en beperkt. Tevens hebben patiënten met hartritmestoornissen veelal levenslange medicamenteuze behandelingen nodig, met als enig alternatief bijzonder kostbare medische interventies. Gezien het suboptimale karakter van de huidige therapieën acht de DEC het van essentieel belang dat er meer specifieke en effectieve behandelingen voor hartritmestoornissen ontwikkeld worden. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. 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 bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief (terminaal) bij de dieren gerechtvaardigd.

## 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

17 februari 2017

- 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 is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 10 maart 2017 16:24  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** status van AVD116002017818

Geachte,

De aanvraag AVD116002017818 is besproken door de CCD en er is besloten deze aanvraag te vergunnen. Omdat de leges nog niet ontvangen zijn kan de aanvraag niet verder afgerond worden. Zodra de leges ontvangen zijn sturen wij de beschikking aan u toe en kunt u aanvangen met de uitvoer van uw project, tot die tijd is de behandelingsperiode opgeschort,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 27 februari 2017 15:47  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vragen bij de behandeling van AVD116002017818

Geachte dr. [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend waar bij de behandeling nog een paar vragen zijn. Het betreft uw project AVD116002017818: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.

U beschrijft het ongerief als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen, in dit geval het hart, verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen?

U beschrijft in de bijlage dierproeven onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden, wanneer dit het geval is, dan zijn de moederdieren onderdeel van dit projectvoorstel en moet u het aantal dieren opnemen onder B. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?

Uit het advies van de DEC volgt dat u de rattenpups dood door middel van decapitatie, waarna de kop in stikstof wordt gedompeld. Hoewel decapitatie als dodingsmethode is opgenomen in bijlage IV van de richtlijn, mag dit slechts toegepast worden wanneer is onderbouwd dat andere methoden niet geschikt zijn. Kunt u deze onderbouwing nog toevoegen onder punt L. in de bijlage dierproeven?

Kunt u in de NTS onder 3.6 de zin 'de dieren zullen overlijden onder narcose' herformuleren naar 'de dieren worden gedood onder narcose'?

Uw aanvraag zal in de vergadering van 10 maart door de CCD besproken worden, kunt u uiterlijk 9 maart de aanvullingen aan ons toesturen? De behandelingsperiode van uw aanvraag is gestopt totdat de aanvullingen ontvangen zijn.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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

.....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden  
Leids Universitair Medisch Centrum  
t.a.v. drs. [REDACTED]  
Postbus 9600  
2300 RC LEIDEN  
[POSTNET]

**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  
AVD116002017818  
**Bijlagen**  
1

Datum 21 maart 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte drs. [REDACTED]

Op 21 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies" met aanvraagnummer AVD116002017818. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 9 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er zijn u vragen gesteld over de classificatie van het ongerief, de onderbouwing van de gekozen dodingsmethode en de formulering van de NTS. U heeft de vragen beantwoord en de documenten aangepast en opnieuw ingediend.

### **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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, is er een algemene voorwaarde gesteld. Zoals u zelf beschrijft onder het punt Vervanging in de bijlage dierproeven, is het gezien de ontwikkelingen in dit onderzoeksveld, niet ondenkbaar dat het binnen de looptijd van 5 jaar mogelijk is om de doelstellingen van dit project zonder proefdieren te behalen. Wij verzoeken u samen met de IvD deze mogelijkheden te blijven onderzoeken.

U kunt met uw project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies" starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 maart 2017 tot en met 28 februari 2021.



Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Datum:**  
21 maart 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD116002017818

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 februari 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  
namens deze:

ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

**Datum:**  
21 maart 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD116002017818



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Academisch Ziekenhuis Leiden

**Adres:** Postbus 9600

**Postcode en plaats:** 2300 RC LEIDEN

**Deelnemersnummer:** 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 maart 2017 tot en met 28 februari 2021, voor het project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies." met aanvraagnummer AVD116002017818, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 maart 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 maart 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 februari 2017, ontvangen op 21 februari 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 9 maart 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Excisie van neonatale ratten harten</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / rattenpups 2 dagen oud	5.760	100% Licht	

### Voorwaarden

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

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.

**Aanvraagnummer:**  
AVD116002017818

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.



**Aanvraagnummer:**

AVD116002017818

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**

AVD116002017818

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

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

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

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

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