

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017924								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
12	Projectvoorstel nieuw				x		x	x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x		x	x	
14	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x		x	x	
15	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x		x	x	
16	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw				x		x	x	
17	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
18	Advies CCD		x						x
19	Beschikking en vergunning				x		x	x	



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 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 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	50169181									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	50169181																
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="0"><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td><td>4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD</td><td>Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td><td></td></tr></table>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6	Postbus	616		Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6															
Postbus	616																
Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht															
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
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="0"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 4 - 2017
- Einddatum 1 - 4 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 2013 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	Maastricht
Datum	13 - 3 - 2017
Handtekening	[Redacted]



Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. 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.

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

Metabool hartfalen, een complex ziektebeeld

Metabool hartfalen

Hartfalen met een behouden ejectie fractie, ook wel HFpEF en metabool hartfalen genoemd, is een groeiend klinisch en maatschappelijk probleem dat voortvloeit uit de risicofactoren horend bij een moderne levensstijl, samenvattend het metabole syndroom. Een kwart van de wereldpopulatie lijdt aan het metabole syndroom, waarbij de meerderheid een combinatie heeft van type 2 diabetes, obesitas en hypertensie, ook wel "diabetesotensie" genoemd (Sharabi 2012). De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de morbiditeit en mortaliteit van het metabole syndroom zijn 1) **microvasculaire (endotheel) dysfunctie**, 2) **ontsteking**, 3) **cardiomyocyt hypertrofie**, 4) **metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen** ten gevolge van o.m. insuline resistentie en hypertensie, en eindorgaanschade met 5) **bindweefselafzetting/fibrose** in bijvoorbeeld het hart (Aroor 2013, Schroen 2012). Deze 5 pathofysiologische processen leiden uiteindelijk tot hartfalen, waarbij er hoofdzakelijk hartfalen met behouden ejectiefractie (HFpEF) ofwel "metabool hartfalen" wordt gezien (Paulus 2013). Een van de belangrijkste kenmerken van HFpEF is diastolische dysfunctie, oftewel een stijf hart dat moeilijk ontspant (Paulus 2013).

Immuunsysteem

In welke mate het immuunsysteem en externe pathogenen bijdragen aan hartfalen al dan niet in combinatie met bovenstaande risicofactoren is nog onbekend. [REDACTED]

Ook is de overleving en hartfunctiebehoud na een myocardinfarct steeds beter door betere en snellere behandelingen. Echter, de 5 pathofysiologische processen van HFpEF spelen in het hart na het overleven van een myocardinfarct ook een centrale rol, en ook hier is het onbekend wat de interactie is tussen het geactiveerde immuunsysteem na een myocardinfarct en de aanwezigheid van diabetesotensie. Zowel de infectie met relatief onschuldige virussen als het overleven van een myocardinfarct kunnen als additionele risicofactoren voor hartfalen worden beschouwd, waarbij immunosuppressie mogelijk een belangrijke rol speelt.

Helaas kan de cardioloog een patiënt met HFpEF – in tegenstelling tot iemand met hartfalen met verlaagde ejectiefractie – geen effectief geneesmiddel aanbieden, waardoor de levenskwaliteit van HFpEF patiënten sterk verlaagd wordt en de mortaliteit wereldwijd exponentieel toeneemt met de groeiende obese en oudere populatie (Nanayakkara S 2015, Horgan 2014). Om een betere behandeling van HFpEF mogelijk te maken is er kennis nodig van de onderliggende pathofysiologische en moleculaire processen, waaronder de (relatieve) bijdragen en interacties van bovengenoemde 5 processen in de diverse organen en systemen die aangedaan zijn tijdens het metabole syndroom, zoals hart, lever, nieren, longen, het zenuwstelsel, het vetweefsel, de pancreas en de skeletspieren.

Huidige stand van zaken

Het is bekend dat de 5 pathofysiologische processen die hierboven beschreven staan, allen bijdragen aan de ontwikkeling van HFpEF. Echter, de (combinatie van) risicofactoren die bijdragen aan de ziekte verschillen per patiënt. Het falen van de vele klinische trials waarbij HFpEF als 1 ziekte werd beschouwd (Nanayakkara 2015), onderstreept het belang van patiënten stratificatie om te komen tot effectieve behandelwijzen met "therapie-op-maat". De cardioloog heeft te maken met 2 problemen: 1) wat is de impact van de diverse risicofactoren en hiermee gepaard gaande pathofysiologische processen op het ziekteverloop in HFpEF patiënten?, en 2) welke therapie-op-maat kan worden aangeboden? Er is grote behoefte aan nieuwe therapeutische targets, die er alleen kunnen komen als er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen (Nanayakkara 2015). Dit project heeft als doel meer inzicht te verkrijgen in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en daarmee nieuwe therapeutische targets te identificeren. Onze groep maakt zich daarnaast sterk om de HFpEF patiëntenpopulatie te helpen stratificeren in samenwerking met cardiologen, radiologen en fysiologen.

Schematisch

Diabetesotensie/ metabool syndroom ± immunosuppressie >>> pathofysiologische mechanismen (in

willekeurige volgorde: cardiale microvasculaire dysfunctie, ontsteking, cardiomyocyt hypertrofie, metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen, en bindweefselvorming) >>> HFpEF/metabool hartfalen

Niet-coderende RNA moleculen spelen belangrijke rollen in pathofysiologische processen

De helft van het zoogdierengenoom bestaat uit niet-eiwit-coderende genen. De hieruit voortkomende niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs" (lncRNAs), spelen een rol in alle (patho)biologische processen, ook in processen die leiden tot hartfalen

Echter, de rol van niet-coderende RNA moleculen, in de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan HFpEF is grotendeels onbekend. Om te komen tot nieuwe inzichten in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en de identificatie van nieuwe therapeutische targets, zal dit project zich daarom richten op de rol van niet-coderende RNA moleculen.

Translationeel potentieel:

Niet-coderende RNA moleculen vormen een even grote groep genen als de eiwit-coderende genen. Niet-coderende RNA moleculen zijn relatief makkelijk te remmen met specifieke medicijnen (bv "antagomirs"), waarvoor de eerste klinische trials al lopen. Het feit in aanmerking nemend dat voor de grote en groeiende groep HFpEF patiënten nog geen therapie beschikbaar is, biedt het exploreren van de rol en mogelijkheden van deze grote groep genen een ongekend therapeutisch potentieel.

Relevante referenties:

- Sharabi Y. Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (diabesotension). Diabetes/metabolism research and reviews 2012
- Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. Metabolism: clinical and experimental. 2013;62:1543-1552
- Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. J Am Coll Cardiol. 2013;62:263-271
- Nanayakkara S, Kaye DM. Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review. Clin Ther. 2015 Oct 1;37(10):2186-98.
- Horgan S et al. Murine Models of Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Journal of Cardiac Failure. 2014 Dec;20(12):984-95
- Patel BM, Mehta AA. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. European journal of pharmacology. 2012;697:1-12

Samenhang tussen hypothesen a-d

De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen, en die worden aangeschakeld door de risicofactoren horend bij het metabole syndroom, beïnvloeden elkaar. Microvasculaire dysfunctie en ontsteking hebben een wisselwerking op elkaar; het door het metabole syndroom geactiveerde endotheel trekt ontstekingscellen aan, en op zijn beurt verhoogt ontsteking de permeabiliteit van de vaten. Tegelijkertijd verlaagt microvasculaire dysfunctie de toevoer van voedingsstoffen en zuurstof naar de cardiomyocyt, leidend tot cardiomyocyt dysfunctie. Cardiomyocyt dysfunctie en ontsteking worden verergerd door verhoogde activatie van het renine-angiotensine-aldosteron systeem en het veranderde aanbod van circulerende suikers en vetzuren tijdens diabetes, en leiden tot apoptose van diverse celtypen en bindweefselvorming.

De **haalbaarheid** van het project wordt ondersteund door:

- a. De beschikbaarheid van diverse cel- en muizenmodellen van hartfalen binnen het instituut.
- b. De toegang tot fenotyperingsapparatuur en -expertise binnen het instituut, alsook de gevestigde moleculaire infrastructuur.
- c. De moleculaire en pathofysiologische achtergrond van de PI [REDACTED]

De beschikking over subsidiegelden van de PI die aan het doel van dit project besteed dienen te worden, en de expertise van de PI met diermodellen.

3.3 Belang

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

Hartfalen is een progressieve en ernstig invaliderende aandoening met een slechte prognose waarvoor geen therapie beschikbaar is anders dan symptoombestrijding. Volgens statistieken van de Nederlandse Hartstichting en het RIVM leven er in Nederland zo'n 200.000 mensen met hartfalen, waarvan de helft HFpEF heeft. De helft van de patiënten overlijdt binnen 5 jaar na diagnose, waarbij er voor de HFpEF populatie geen effectieve behandeling voorhanden is. Risicofactoren voor de ontwikkeling van HFpEF zijn hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas. Veel patiënten hebben een combinatie van deze risicofactoren (diabetes), maar zelden worden de risicofactoren tezamen bestudeerd. Tevens is over de progressie van prediabetes naar vergevorderd diabetes niet veel bekend, daarom worden modellen bestudeerd. Deze fundamentele en translationele studie zal bijdragen aan de opheldering van de mechanismen die leiden tot HFpEF, door de combinatie van hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas als uitgangspunt te nemen, en de rol van niet-coderende RNA moleculen te bestuderen die in deze condities geïmpliceerd zijn. Op termijn hopen we met de vergaarde kennis te helpen voorkomen dat mensen hartfalen ontwikkelen danwel hieraan overlijden. Dit is zowel sociaal als economisch van grote maatschappelijke relevantie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

1) Kandidaatgenen

Uit diverse reeds gecompleteerde screens voor identificatie van niet-coderende RNA moleculen betrokken bij processen die hartfalen beïnvloeden, zijn kandidaat moleculen voor *in vivo* bestudering geselecteerd:

- *in vitro* screen van 194 microRNAs, waarbij deze tot overexpressie zijn gebracht in cardiomyocyten, bindweefselcellen [REDACTED] De readouts

van de respons van de cellen op de verhoogde expressie van de microRNAs zijn gerelateerd aan aspecten van de ontwikkeling van hartfalen, respectievelijk celgroei, bindweefselvorming en ontstekingsrespons.

- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in humane hartbiopten van mensen met hartfalen (waaronder HFpEF (ongepubliceerd) en viraal hartfalen [redacted] en gezondere controles.
- Deep sequencing resultaten (ongepubliceerd) die expressie tonen van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in een ratten model van HFpEF.
- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in muizenmodellen van hartfalen (TAC, Angiotensine II en viraal hartfalen, zie bijvoorbeeld [redacted])

We beschikken op dit moment over een lijst van **60 kandidaatgenen** die afkomstig zijn uit deze bestaande datasets. Voor deze eerste stap van het onderzoek zijn derhalve geen dierproeven nodig. Deze 60 kandidaatgenen zullen in stap 2) *in vitro* gevalideerd worden.

2) Validatie in historische samples en in *in vitro* modellen

Geselecteerde niet-coderende RNA kandidaten zullen **gevalideerd** worden in

- a) reeds verzamelde monsters van muizenharten, rattenharten en humane hartbiopten middels
 - a. expressie-analyses
 - b. geoptimaliseerde histologische en *in vitro* technieken (zie bvb [redacted] ter bepaling van de bron van expressie (celtype)
Voor deze stap wordt gebruik gemaakt van historische monsters en zijn geen proefdieren nodig.
- b) de geïdentificeerde cellen van oorsprong ter bepaling van de moleculaire processen waarbij deze kandidaten betrokken zijn. Hiertoe worden cellen geïsoleerd uit proefdieren.

De te bestuderen moleculaire processen betrokken bij de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF en gerelateerd aan de 5 beschreven pathofysiologische processen zijn:

1. hypertrofie van cardiomyocyten
2. cardiomyocyt metabolisme
3. endotheelcel proliferatie en functie
4. ontstekingsparameters in elk cardiaal celtype, met name cardiomyocyten, endotheel- en ontstekingscellen
5. bindweefselvorming door fibroblasten

De bron van de te gebruiken cellen is deels cellijnen (cardiomyocyten, endotheelcellen, fibroblasten, ontstekingscellen), maar gezien de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun metabolisme en groei in deze cellen (zie bvb Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes) – processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen - is het van belang de processen ook in de volgende primaire cellen te bestuderen:

- Neonatale rat cardiomyocyten > bestudering van celgroei (oorsprong: wild type)
- Adulte rat cardiomyocyten > bestudering van metabolisme (oorsprong: wild type op controle dieet of hoog vet dieet)
- Neonatale rat cardiale fibroblast > bestudering van bindweefselvorming (oorsprong: wild type)
- Beenmergcellen geïsoleerd uit de muis die *in vitro* worden gedifferentieerd tot macrofaag > bestudering van ontstekingsrespons (oorsprong: wild type en transgene muizen)

NB. Het gebruik van neonatale cellen voor de bestudering van "volwassen" hartfalen processen heeft voor- en nadelen. Voordeel is dat hartfalen in feite deels een herprogrammering van cardiomyocyten is richting neonatale genexpressie, wat dit model zeer representatief maakt. Aan de andere kant zijn deze cellen nooit volwassen geweest, dus ondergaan geen herprogrammering. Neonatale hartspiercellen zijn door hun relatieve toegankelijkheid (gemak van isolatie) en gemak om mee te kweken het meest gebruikte en geaccepteerde *in vitro* model

van hypertrofie en hartfalen (Louch et al. J Mol Cell Cardiol. 2011 Sep; 51(3): 288–298).

We schatten in zo'n **20 kandidaatgenen** te kiezen naar aanleiding van resultaten uit bovenstaande *in vitro* experimenten, om deze in stap 3) *in vivo* te bestuderen. Dit aantal is een schatting gebaseerd op 1) ervaring met het valideren van grootschalige genexpressie data, die in de praktijk in $\pm 70\%$ van de genen worden bevestigd, 2) het daarop volgende uitgebreide literatuuronderzoek om uit te sluiten dat de rol van een kandidaatgen al door andere onderzoekers wordt onderzocht, en 3) onze ervaring met het pre-valideren van de functies van kandidaatgenen middels *in vitro* celexperimenten, waaruit blijkt dat een klein deel van de kandidaatgenen geen actieve rol spelen in hartfalen processen.

3) Onderzoek in diermodellen

Voor kandidaatgenen die de validatiestap hebben doorstaan zal de rol, waaronder de causale betrokkenheid, in de in punt 3.4.2 voorgestelde **dierenmodellen** van metabool syndroom en hartfalen worden onderzocht. In deze dierenmodellen zullen niet-coderende RNA moleculen gemanipuleerd worden middels remmende oligo's (antimiRs voor microRNAs en gapmers voor long non-coding RNAs), overexpressie met behulp van virale vectoren of mimics of door gebruik van transgene modellen (bvb ██████████). De dierenmodellen zullen in punt 3.4.2 in meer detail worden beschreven. Het besluit voor het soort diermodel wordt genomen o.b.v. de directe betrokkenheid van het kandidaatgen bij minimaal een van de 5 pathofysiologische processen, zoals beschreven in 3.4.3 (zie ook schematische weergave van de keuzemomenten bij punt 3.4.3). Bij een multifactoriële aandoening als HFpEF is het bijvoorbeeld mogelijk dat een kandidaatgen direct 1 pathofysiologisch proces beïnvloedt en indirect (meerdere) andere.

4) Valorisatie

De resultaten zullen in internationale peer-reviewed wetenschappelijke tijdschriften worden gepubliceerd. Er zal bekeken worden hoe de data in een patent verwerkt kunnen worden. Omdat de geselecteerde targets obv hun expressiepatroon ook een rol lijken te spelen in humaan hartfalen, kan snel de stap worden gezet richting klinische translatie, waarbij de korte lijnen met de kliniek aangesproken zullen worden. In samenwerking met partners van de farmaceutische industrie zullen therapeutische targets in een groter proefdiermodel van hartfalen worden onderzocht, als eerste stap richting klinische toepassing.

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

Onderstaande dierenmodellen (**Tabel 1**) zijn gekozen obv hun relevantie voor het bestuderen van hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom of de individuele componenten vallend onder het metabole syndroom; diabetes, obesitas, hypertensie en virale aanwezigheid (Horgan 2014; ██████████). Elk diermodel zal een bijdrage leveren aan het begrip van de onderliggende pathofysiologische mechanismen die tot hartfalen/HFpEF leiden, dus cardiomyocyt dysfunctie, cardiale microvasculaire dysfunctie, ontsteking, insuline resistentie en bindweefselvorming. De 20 niet-coderende RNA moleculen die in dierenmodellen zullen worden onderzocht voor hun causale bijdrage aan HFpEF zullen in 1 of meerdere (maximaal 5) van onderstaande dierenmodellen worden bestudeerd. Literatuur ondersteunt het combineren van verschillende dierenmodellen om te komen tot zinvolle translationele bevindingen (Horgan 2014). De keuze van het diermodel wordt bepaald door de resultaten van de *in vitro* studies uit stap 2 van de beschreven strategie (3.4.1). Omdat NSAID's en opioïden interfereren met ontsteking, zal in geval dat ontsteking een primaire uitkomstmaat is, afgeweken worden van de GV SOLAS richtlijnen voor pijnbestrijding en geen analgesie toegepast worden. In dat geval worden de humane eindpunten nog scherper omlijnd.

Tabel 1. ██████████

██████████



* hoog vet dieet veroorzaakt pre-diabetes.

**Hoewel TAC een acuut model van drukoverbelasting is, in tegenstelling tot een meer progressief verloop in mensen, reproduceert het model meerdere pathofysiologische processen die ook in de mens plaatsvinden, inclusief hypertrofie en diastolische dysfunctie (Monnet et al. Ann Thorac Surg 2005; Horgan et al. Journal of Cardiac Failure 2014; Respress et al. Circ Res 2012).

***Phenylephrine wordt gebruikt als model voor acute drukoverbelasting, voor het aanschakelen van immediate early genes en signaleringspaden in cardiomyocyten (Bueno et al. Circ Res 2001;88:88-96).

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.

Algemene doelstelling

De algemene doelstelling van het project is nieuwe therapeutische targets te vinden voor de behandeling van HFpEF. Als strategie is gekozen allereerst kandidaatgenen die uit bestaande datasets komen te manipuleren in relevante celmodellen *in vitro*. Op basis van de rol die dan gevonden wordt voor een bepaald kandidaatgen, wordt een keuze gemaakt voor het *in vivo* muizenmodel: AngII infusie of TAC, eventueel in combinatie met hoog vet dieet (als de kandidaat ook een rol heeft in metabolisme), of CVB3 infectie. Als uit een eerste *in vivo* experiment blijkt dat het kandidaatgen een rol heeft in pre-diabetes (AngII/TAC en hoog vet dieet), wordt een tweede *in vivo* experiment uitgevoerd met een ander muizenmodel van diabetes tensie dat een meer gevorderd stadium van diabetes onderzoekt: diabete *db^{-/-}* muizen in combinatie met drukoverbelasting door AngII infusie of TAC.

Samenhang tussen onderdelen

De samenhang tussen de beschreven dierproeven wordt bepaald door de samenhang tussen de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan hartfalen. Deze 5 processen vinden altijd in combinatie met elkaar plaats tijdens de ontwikkeling van hartfalen. Echter, hun individuele bijdrage

verschilt afhankelijk van de betrokken risicofactoren. Bijvoorbeeld, bij enkel hypertensie als onderlegger zijn er relatief minder metabole veranderingen in het hart, en bij enkel diabetes of obesitas is er relatief minder cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming in het hart. In aanwezigheid van een virus of na een myocardinfarct zal de ontstekingsrespons het sterkst zijn. Het manipuleren van kandidaatgenen die op 1 of meer van de 5 processen aangrijpen, maakt het mogelijk de mate van causale betrokkenheid bij hartfalen van deze processen in kaart te brengen, en maakt het tegelijkertijd mogelijk om nieuwe therapeutische targets te identificeren. Om die reden zal voor elk kandidaatgen eerst de betrokkenheid bij de 5 processen in kaart worden gebracht middels *in vitro* experimenten die de 5 processen artificieel uit elkaar trekken, en vervolgens zal op basis van de resultaten een *in vivo* model gekozen worden dat de gevonden betrokken processen het best representeert (**Tabel 2**).

Tabel 2.

Keuzemomenten en go/no-go momenten:

- 1) Validatie van de expressie van kandidaatgenen in historische samples: van 60 naar 20 kandidaatgenen. Van deze 20 gekozen kandidaatgenen worden in deze stap het celtype/bron van expressie bepaald, zodat *in vitro* validatie experimenten in stap 2 gericht op relevante celtypen kunnen worden opgezet.
In deze eerste stap, die enkel gebruik maakt van historische samples, komen we dus tot 20 kandidaatgenen voor bestudering in nieuwe proefdierexperimenten.

- 2) validatie in *in vitro* modellen middels manipulatie van de individuele kandidaatgenen in hun celtype van oorsprong: wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in cellulaire readouts van een van de 5 pathofysiologische processen betrokken bij hartfalen? Hierbij wordt gebruik gemaakt van zowel cellen uit neonatale dieren, die met name celgroei reflecteren, als cellen uit adulte dieren, die celmetabolisme en productie van bvb bindweefsel reflecteren.

- *Go/no-go moment:* -

Ja > verfijning van hypothese en verder met stap 3.

- Kandidaatgenen die een rol hebben in cardiomyocyt en/of microvasculaire dysfunctie zullen in stap 3 worden onderzocht in een muismodel van drukoverbelasting, cardiomyocyt en microvasculaire dysfunctie door TAC, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet.
- Kandidaatgenen die een rol hebben in fibrose en/of ontsteking zullen in stap 3 worden onderzocht in muismodellen van drukoverbelasting, fibrose en ontsteking door AngII, al dan niet in combi met hoog vet dieet.

Nee > stop.

- 3) validatie in *in vivo* model: heeft het kandidaatgen een rol in hartfalen? Hiertoe zal het

kandidaatgen in een diermodel van hartfalen worden gemanipuleerd, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet. Keuze van diermodel(len) wordt bepaald door de verfijnde hypothese uit stap 2. Wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF?

- *Go/no-go moment:* -

Ja > verfijning van de hypothese en nieuw dierexperiment met andere oorzaak leidend tot hartfalen. De verwachting is dat de meeste kandidaatgenen (16 van de 20) een rol blijken te hebben in hartfalen; uit onze ervaring blijkt dat de *in vitro* validatie stap een optimale keuze van kandidaatgenen mogelijk maakt.

Nee > stop.

- 4) Tweede validatiestap in *in vivo* model(len): heeft het kandidaatgen een rol in een ander model van hartfalen, en welke? In deze stap zullen we de rol van het kandidaatgen in een ander model van hartfalen bepalen, alsook inzoomen op het celtypen waarin het kandidaatgen een rol speelt, en de vroege kandidaatgen-afhankelijke processen die betrokken zijn tijdens de ontwikkeling van hartfalen.
- 5) Valorisatie: plannen van vervolgstappen om kandidaatgen richting therapeutische toepassing te sturen. Hieronder vallen patentering, samenwerking opstarten met farmaceutische industrie voor financiering van experimenten in grotere proefdieren, publicatie, en uiteindelijk klinische trials.

Voorbeeld 1: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in hypertrofe harten en in historische cardiomyocytmonsters. In stap 2) zullen daarom neonatale rat cardiomyocyten gebruikt worden voor het bestuderen van celgroei responsen na manipulatie van het molecuul, en adulte rat cardiomyocyten voor het bepalen van metabole effecten na manipulatie van het kandidaatgen. Er zal gebruik worden gemaakt van adulte ratten die op een controle dieet hebben gestaan, of die zijn blootgesteld aan een hoog vet dieet.

Uit stap 2) komt dat het molecuul een rol heeft in cardiomyocyt metabolisme. Daarom zal in stap 3) het molecuul worden gemanipuleerd in een pre-diabetes model van muizen met hoogvetdieet en drukoverbelasting door TAC. Aan het einde van het experiment zal de hartfunctie van het dier in kaart worden gebracht (een van de twee primaire uitkomstparameters, naast cardiomyocyt dysfunctie), waarna het geexplanteerde hart onderworpen wordt aan uitgebreide moleculaire, cellulaire en histologische analyses die voor muis zijn opgezet en een beeld zullen geven van de moleculaire processen waarin het kandidaatmolecuul een rol heeft.

Als er een rol gevonden wordt voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het kandidaatgen vervolgens in stap 4) op maximaal 4 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetesotensie, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van TAC met hoogvetdieet voor het isoleren van cellen uit het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met TAC en hoogvetdieet voor het bepalen van celresponsen (vroege cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; en d) acute PE injectie voor het bepalen van de "immediate early" responsen in het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken).

Voorbeeld 2: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in virale myocarditis en in historische beenmergmacrofaag monsters. In stap 2) zullen daarom beenmergcellen gebruikt worden voor het bestuderen van inflammatoire responsen na manipulatie van het kandidaatgen.

Uit stap 2) komt dat het kandidaatgen een rol heeft in macrofagen. [REDACTED]

[REDACTED] Daarom zal in stap 3) het gen worden gemanipuleerd in een model van drukoverbelasting door Angiotensine II met als primaire uitkomstparameter hartfunctie. Als er een rol wordt gevonden voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het vervolgens in stap 4) op maximaal 5 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetesotensie, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van het eerdere AngII experiment voor het

isoleren van cellen uit het hart (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met AngII voor het bepalen van celresponsen (vroeg cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; d) virale myocarditis door CVB3 infectie met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder pathogene en metabole condities (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken); en e) myocardinfarct met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder steriele pro-inflammatoire en metabole condities (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken).

Keuzemomenten schematisch (besluitmodel):



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten
2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen
3	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen
4	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene $db^{-/-}$ muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Overgewicht, suikerziekte, hart- en vaatziekten, ontsteking, nieuwe genen

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 checked="" 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>Overgewicht, suikerziekte en hoge bloeddruk komen vaak gelijktijdig voor, dit wordt ook wel “metabool syndroom” genoemd. Mensen met het metabole syndroom krijgen vaak hartfalen. Met de groeiende populatie ouderen, en de toename van het metabool syndroom bij deze groep, zal het aantal patiënten met hartfalen exponentieel stijgen.</p> <p>Hoewel hartfalen ten gevolge van een hartinfarct redelijk goed te behandelen is, kan de cardioloog patiënten met hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom geen therapie bieden. Om die reden is er fundamenteel wetenschappelijk onderzoek nodig naar nieuwe therapieën. Het doel van het huidige onderzoek is de rol van nieuwe genen, hierna “kandidaatgenen”</p>
---	---

	genoemd, te onderzoeken in diermodellen van hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom om zo de processen die hartfalen veroorzaken bij deze patiënten te ontrafelen.
3.2	<p>Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p> <p>Wetenschappelijk belang: Verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen.</p> <p>Maatschappelijk belang: Hartfalen is invaliderend voor de patiënt, belastend voor de familie, en gaat gepaard met hoge kosten voor gezondheidszorg en maatschappij. Met dit onderzoek kunnen nieuwe strategieën voor therapie bij hartfalen ontwikkeld worden, zodat deze patiënten beter behandeld kunnen worden en de negatieve aspecten worden verminderd.</p>
3.3	<p>Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p> <p>-192 moederratten -1920 pasgeboren ratten -720 volwassen ratten -18848 muizen</p>
3.4	<p>Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?</p> <p>De dieren zullen hartfalen ontwikkelen, soms in combinatie met overgewicht en suikerziekte. Het leven met deze aandoeningen is beperkend. Dieren kunnen last hebben van kortademigheid, futloosheid en een verminderde fysieke gezondheid.</p>
3.5	<p>Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?</p> <p>Ratten: 2832 (100%) 1. terminaal experiment (geen handelingen): 1920 rattenpups, 600 volwassen ratten (89%) 2. ongerief is licht: 312 volwassen ratten (11%)</p> <p>Muizen: totaal 18848 (100%) 1. terminaal experiment (geen handelingen): 288 (2%) 3. ongerief is matig: 17920 (95%) 4. ongerief is ernstig: 640 (3%)</p>
3.6	<p>Wat is de bestemming van de dieren na afloop?</p> <p>Er wordt euthanasie gepleegd, waarna de organen uitgebreid geanalyseerd zullen worden. Uitzondering: voor moederdieren wordt waar mogelijk een nieuwe bestemming gevonden.</p>

4 Drie V's

4.1	<p>Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p> <p>Voordat een dierproef wordt uitgevoerd, toetsen we eerst de hypothese van betrokkenheid van kandidaatgenen bij hartfalen in weefsels van eerdere dierstudies, in cellijnen en in humane weefsels verkregen tijdens operaties. Als de hypothese standhoudt, zal een dierstudie gestart worden om vast te stellen of het kandidaatgen hartfalen veroorzaakt of ertegen beschermt. Dierstudies blijven nodig zolang er geen alternatieven bestaan die de complexe processen kunnen nabootsen die plaatsvinden bij patiënten met het metabole syndroom en bij de ontwikkeling van cardiovasculaire ziekte.</p>
-----	--

4.2 Vermindering

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

Onze jarenlange ervaring in het zoeken naar processen die ten grondslag liggen aan hartfalen maakt het mogelijk goed onderbouwde statistische berekeningen te doen, waardoor het gebruikte aantal proefdieren zo klein mogelijk is. De proeven worden volgens een stappenplan uitgevoerd:

1. Bepaling van rol van kandidaatgenen in hartcellen van rat of muis, die soms een hoog vet dieet gevoerd krijgen gedurende een aantal weken. Het ongerief is licht voor 11% van de ratten (312 ratten). Voor 89% van de ratten (2520 ratten) en 2 % van de muizen (288 muizen) gaat het om terminale experimenten zonder handelingen.
2. Kandidaatgenen, waarvoor in stap 1 een rol gevonden is in processen die bijdragen aan hartfalen, worden onderzocht in een muismodel van hartfalen. Het ongerief is matig (17% van de muizen (3200 muizen) worden in deze stap onderzocht).
3. Bij bevestiging van de hypothese, wordt de rol van het kandidaatgen bepaald in andere muismodellen van hartfalen en op andere momenten tijdens de ontwikkeling van hartfalen. Het ongerief is matig (78% van de muizen; 14720 muizen) tot ernstig (3% van de muizen; 640 muizen).

In totaal ondervindt 95% van de muizen (17920 muizen) in stappen 2 en 3 matig ongerief, en 3% (640 muizen) ernstig ongerief.

4.3 Verfijning

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

De muis en rat ontwikkelen hartfalen op een manier die vertaalbaar is naar de mens. De bestudering van specifieke kandidaatgenen is alleen mogelijk bij deze knaagdieren.

Onze jarenlange ervaring met het onderzoeken van oorzaken van hartfalen in dierstudies maakt, naast het beperken van de aantallen, het ongerief zo gering mogelijk.

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

De dieren krijgen altijd adequate pijnstilling en verdoving, en worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. De experimenten worden uitgevoerd door bevoegd en competent personeel.

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) ratten, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten extern worden besteld. Voor de moederdieren zal na het werpen een ander doel worden gezocht. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïnccludeerd.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van wild type ratten, eventueel in combinatie met hoog vet dieet. Deze zullen direct voor de isolatie op humane wijze worden opgeofferd. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïnccludeerd. De keuze voor volwassen dieren wordt gemaakt op het moment dat een kandidaat molecuul een rol heeft in het metabolisme van de cardiomyocyt, omdat 1) deze uitleesparameter in cellijnen en in neonatale cellen niet of beperkt te meten is, en 2) een volwassen dier langere tijd blootgesteld kan worden aan metabole parameters in de circulatie, zoals een hoog vet dieet. Een hoog vet dieet induceert een pre-diabetische status in ratten en dit maakt het mogelijk om de chronische effecten van verhoogd circulerend insuline, glucose en vetzuren op cardiomyocyt metabolisme te bestuderen.

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

De neonatale dieren worden direct voor de isolatie opgeofferd. Voor de moederdieren zal na het werpen een ander doel worden gezocht. De dieren ondergaan geen behandelingen.

Volwassen rat cardiale myocyten

Volwassen ratten ondergaan ofwel geen behandeling, of ze krijgen een hoog vet dieet gedurende maximaal 24 weken, of een gematcht synthetisch controle dieet, een "normaal vet dieet". De dieren worden direct voor de celisolatie op humane wijze opgeofferd.

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

In ons lab en binnen het onderzoeksinstituut CARIM hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van primaire harspieren en met het gebruik van deze cellen voor experimenten (zie bijvoorbeeld ██████████

██████████ Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groepsgrootten; onze ervaring is dat 4 biologische replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) rattenpups. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten worden besteld.

Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 1.5 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **1920 dieren**. Voor de moederdieren gaan we uit van gemiddeld 10 pups per drachtige moeder. In totaal gaat het dan om **192** moederdieren.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van volwassen ratten. Uit eerdere ervaringen met volwassen rat cardiomyocyten, in samenwerking met een andere onderzoeksgroep, is gebleken dat voor onze experimenten per rat voldoende cellen geïsoleerd worden voor 1 biologische replicaat met 4 experimentele condities, bijvoorbeeld controle sham, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie sham en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd. Vier biologische replicaten per groep van alle condities geven optimale statistiek en er zijn 3 experimentele readouts (genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie). Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom $3 \times 4 = 12$ ratten nodig.

-*Gezonde ratten*: Voor de validering van 50 van de 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen in gezonde ratten hebben we daarom nodig $50 \times 12 =$ maximaal **600 ratten**. De leeftijd van de volwassen ratten op het moment van isolatie is niet van invloed op de kwaliteit van de cardiomyocyten in gezonde condities van de rat.

-*Ratten op speciaal dieet*: Cardiomyocyten die geïsoleerd worden uit pre-diabetische ratten op hoog vet dieet en "normaal vet dieet"-gevoerde controle ratten, naar schatting voor de validering van 10 kandidaat niet-coderend RNA moleculen, zullen bij aanvang (start dieet) 2-4 maanden oud zijn. Hiervoor zijn 10 kandidaatgenen $\times 12$ ratten per gen $\times 2$ groepen = **240 ratten** benodigd.

Estrogenen hebben een aanzienlijk effect op regulatie van glucose opname, GLUT4 translocatie, vetzuuropname en CD36 translocatie in het hart (Murphy E, Heart Fail Rev. 12: 293-300, 2007; Tepavcevic S, Horm Metab Res. 43: 524-30, 2011). Vanwege deze effecten van estrogenen kunnen de gegevens van beide sexen niet worden gecombineerd. Derhalve zou een gebruik van beide sexen een verdubbeling van de aantallen betekenen. Wij hebben gekozen om alleen experimenten te doen met mannelijke ratten om daarmee de effecten van estrogenen uit te sluiten.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire cardiale cellen. Echter, de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun differentiatiepotentieel, metabolisme en groei (zie bijvoorbeeld Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes)– processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen – maakt ze ongeschikt voor het bestuderen van de processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen secundair aan het metabole syndroom, namelijk metabolisme, celgroei en –differentiatie.

-Het gebruik van organoiden zal in de toekomst overwogen worden, maar momenteel zijn er nog geen organoiden van het hart ten behoeve van het bestuderen van hartfalenprocessen beschikbaar.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen, omdat hiermee slechts naar expressiepatronen gekeken kan worden, en in de samples geen interventie meer mogelijk zijn. De historische samples zullen de benodigde (cel)experimenten wel verminderen, omdat ze het selecteren van kansrijke kandidaatgenen ondersteunen.

Vermindering:

-Tijdens 1 isolatie van neonatale ratten worden zowel cardiale myocyten als fibroblasten gekweekt. Beide celtypen zullen gebruikt worden voor experimenten. De celcultuur is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Wanneer van tevoren duidelijk is dat een geplande isolatie niet nodig is, zal deze tijdig geannuleerd worden.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties verminderd.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloed; de dieren ondergaan geen behandelingen of enkel een hoog vet dieet, dus geen invasieve behandelingen. Enkel wanneer er een indicatie is dat de beoogde kandidaat niet-coderend RNA moleculen een rol spelen in metabolisme, zal hun rol bestudeerd worden in cardiomyocyten van pre-diabetische ratten geïnduceerd door een hoog vet dieet. De cellen die uit de volwassen harten geïsoleerd worden zijn uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep, en er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd.

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

De dieren gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun hart voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Moederdieren kunnen lichte stress ervaren

Volwassen rat cardiale myocyten

-Gezonde ratten: geen aantasting van welzijn verwacht.

-Ratten op speciaal dieet: De ratten die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen mogelijk huidproblemen, pre-diabetische symptomen zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie/polydipsie en verminderde fysieke gezondheid. Het "normaal vet dieet" is gelijkaardig aan een regulier dieet, echter is net als het hoog vet dieet synthetisch met bekende samenstelling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Verstoring van nest

Volwassen rat cardiale myocyten

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetische staat in de rat.

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

Bij het bereiken van humane eindpunten zullen de dieren voortijdig worden opgeofferd.

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.

Bij gebrek aan ondernemingsgedrag, ernstige huidproblemen, immobiliteit en apathie zal een dier voortijdig worden opgeofferd.

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

0-5% van de dieren op een hoog vet dieet.

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.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Neonatale ratten: terminaal

Moeder ratten: licht

Volwassen rat cardiale myocyten

Gezonde ratten: terminaal

Normaal vet dieet-gevoede ratten: terminaal

Hoog vet dieet-gevoede ratten: licht

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.

De neonatale en volwassen dieren worden gedood omdat hun hart volledig nodig is voor de isolatie van de cardiale cellen.

De moederdieren worden wanneer mogelijk in leven gehouden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>Isolatie van beenmergcellen uit muizen</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen
Volgnummer	Type dierproef					
2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen					

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 zal gebruik worden gemaakt van volwassen, wild type en transgene muizen, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd. De primaire uitkomstparameter is beenmerg isolatie tbv de isolatie van immuuncellen.

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.

Zowel de tibia's als de femurs zullen operatief verwijderd worden na euthanasie van de muis. Opeenvolgend worden na de uiteindes van de femurs en de tibias verwijderd zodat het beenmerg met een natuurlijke zoutoplossing uit de botjes kan worden gespoeld.

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

In ons lab hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van beenmergcellen uit muizen voor experimenten (zie bijvoorbeeld [REDACTED]). Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groepsgrootten; onze ervaring is dat 4 replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van mannelijke en vrouwelijke muizen. Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per

experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 10 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **288 dieren**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire beenmerg cellen. Echter, deze aanpak geeft de mogelijkheid om de polarisatie (richting pro- of anti-inflammatoire macrofaag) en differentiatie van de geïsoleerde beenmergcellen te reguleren en te bestuderen, en de rol van kandidaat moleculen hierin. Daarnaast is het gebruik van cellijnen niet gewenst aangezien reeds gedifferentieerde cellen andere eigenschappen bezitten, verder verwijderd van de gewenste kenmerken (Passmore et al., Immunology 2001).

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen maar wel verminderen.

Vermindering:

-De celtoegankelijkheid is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Tevens worden zowel de tibia als de femur gebruikt om het aantal geïsoleerde cellen zo hoog mogelijk te maken.

-Indien mogelijk worden beenmergcellen geogst uit muizen die voor een ander experimenteel doel werden geëuthanaseerd.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties verminderd.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloedt; de dieren ondergaan geen behandelingen. De cellen afkomstig van beenmerg isolatie worden uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep.

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

De dieren gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun beenmerg voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

nvt

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.

terminaal

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.

De muizen worden gedood omdat hun beenmerg volledig nodig is voor de isolatie van de immuuncellen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.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 |
|------------|--|
| 3 | Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Arteriële hypertensie, aortaklepverkalking, myocardinfarct en virale infectie zijn belangrijke risicofactoren voor het ontwikkelen van hartfalen. Vaak hebben patiënten ook andere aandoeningen die onder het metabole syndroom vallen, zoals overgewicht en diabetes.

- Angiotensine II (AngII) is een peptide dat vrijkomt onder hypertensieve omstandigheden en zowel in de circulatie als perifeer werkt op de vaten (constrictie) en op de cellen (het promoot celgroei, ontsteking, bindweefselvorming). Om deze reden wordt in ons onderzoek vaak gekozen om chronische arteriële hypertensie na te bootsen en hartfalen te veroorzaken in muizen middels subcutane chronische angiotensine II infusie gedurende maximaal 12 weken. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van AngII en daarom volstaat een meting middels tail cuff.
- Phenylephrine is een sympathomimetisch medicijn dat de acties van epinephrine nabootst en arteriële hypertensie veroorzaakt, en wordt in experimentele modellen gegeven om acute hypertensie te veroorzaken en de onmiddellijke respons van het hart hierop te onderzoeken.
- Transverse aortic constriction (TAC) is de meest gebruikte en bestudeerde methode om aortaklepverkalking, leidend tot acuut hartfalen, na te bootsen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de drukgradient in de aortaboog gekwantificeerd kan worden, wat het mogelijk maakt om linker ventrikel hypertrofie te stratificeren. De acute hypertensie geïnduceerd door TAC veroorzaakt een 50% toename in linker ventrikel massa binnen twee weken, daarom is dit model een goede keuze voor het bestuderen van farmacologische and moleculaire interventies die hypertrofie kunnen remmen.
- Myocardinfarct (MI) in de muis is een veelgebruikt model om myocardremodellering in de mens, na

een infarct of bij vaatlijden, na te bootsen. Het afsterven van een deel van het hartweefsel veroorzaakt ontsteking en in tweede fase remodelering van het gezonde hartweefsel, inclusief cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming.

- Een acute virale infectie leidt tot verhoogde hartcelafbraak en ontsteking, en vormt daardoor een levensbedreigende situatie. Coxsackievirus B3 (CVB3)-infectie geïnduceerde myocarditis is het meest gebruikte en best bestudeerde model van acute myocarditis-geïnduceerd hartfalen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de ziekte progressie, cardiale ontsteking gevolgd door afbraak van hartspiercellen en fibrose vorming, nauw verwant is aan het klinische beeld.

AngII-behandeling, TAC, MI of CVB3 wordt gecombineerd met een hoogvetdieet in het geval het kandidaat niet-coderend RNA molecuul een rol blijkt te hebben in metabolisme.

De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis kan op twee manieren gebeuren:

- 1) injectie van een korte DNA sequentie al dan niet in een vector (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde virale vector)
- 2) transgene muis

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.

Het dier zal een aantal behandelingen ondergaan:





- ¹⁾ deze handeling vindt niet plaats in transgene muizen waarin het kandidaat molecuul genetisch is gemodificeerd. In geval van injectie met adeno-geassocieerde virale vectoren, duurt het bereiken van optimale expressieniveaus is het hart 2-3 weken, waarna verdere behandeling pas kan plaatsvinden.
- ²⁾ deze handeling vindt enkel plaats voor kandidaat RNA moleculen waarvoor een functie in metabolisme is gevonden
- ³⁾ deze handeling vindt enkel plaats bij AngII behandeling

Een dier is maximaal 12 (max tijd tussen neonatale injectie en start behandeling) + 24 (max duur behandeling) = 36 weken in experiment. Dieren zijn nooit ouder dan 1 jaar bij opoffering.

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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groepsgrootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke wildtype of genetisch gemodificeerde muizen. Indien de genetisch gemodificeerde muizen reeds gefenotypeerd zijn door andere onderzoekers, zal gebruik worden gemaakt van muizen die onder normale niet-pathologische omstandigheden geen ongerief ondervinden van de genetische modificatie. Indien de genetisch gemodificeerde muizen nog gemaakt moeten worden, zal dit uitbesteed worden en zal het ongerief geregistreerd worden alvorens de dieren tbv dit onderzoek binnengehaald worden. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul zal gebruik worden gemaakt van maximaal 160 muizen. Er zijn maximaal 4 experimentele groepen (A1-A4) nodig. Per experimentele groep schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 40 muizen te gebruiken (20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie).

In 5 jaar tijd zullen maximaal 20 kandidaat moleculen onderzocht worden volgens het besluitmodel uit het projectvoorstel.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in cardiomyocyt dysfunctie en/of endotheeldysfunctie, zal gekozen worden voor TAC als experimenteel model van chronisch hartfalen.
 - o Vervolgens worden maximaal 16 kandidaatgenen ook onderzocht in een acuut model van arteriele hypertensie middels PE injectie, waarbij de primaire uitkomstparameter enkel cardiomyocyt hypertrofie is. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het TAC experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire

uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na TAC (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in ontsteking en/of bindweefselvorming, zal gekozen worden voor AngII als experimenteel model van hartfalen. Hierbij zullen per kandidaatgen maximaal 2 experimenten plaatsvinden voor het bepalen van de primaire uitkomstparameters; cellulaire responsen worden best gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week) en hartfalen wordt best gemeten laat na AngII (max 12 weken).
 - o Vervolgens wordt de rol van maximaal 16 kandidaatgenen ook bestudeerd in maximaal twee andere modellen van hartfalen waarbij ontsteking een rol speelt, namelijk MI- en/of CVB3-geïnduceerd hartfalen. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het AngII experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.
- Als genen ook een rol in metabolisme hebben, wordt gekozen voor een combinatie van AngII, TAC, MI of CVB3 met hoog vet dieet.

Voor elk experiment zijn per kandidaat molecuul maximaal 160 muizen nodig. De volgende tabel geeft een samenvatting van de aantallen per experimenttype:

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, of genetisch gemodificeerde muizen, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren (AAV) voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen (intracardiale injecties) of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van neonatale muizen voor de injectie van het AAV, wordt pas met AngII/hoog vet dieet/TAC operatie/MI operatie/PE begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud). CVB3 wordt geïnjecteerd in muizen van minimaal 4 weken oud.

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: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoïden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoïden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, celexperimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groepsgrootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige AngII model is een redelijk verfijnd model om hartfalen te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken. Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken. Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC en MI operaties uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. Het model van CVB3 infectie is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om virale myocarditis te onderzoeken en door gebruik te maken van CVB3-geïnjecteerde muizen kunnen we de virale en ontstekingsrespons in het hart en de daaropvolgende ontwikkeling van hartfalen bestuderen (Fairweather and Rose PMC 2008). Het PE model is een geaccepteerd model van acute arteriële hypertensie met directe effecten op cardiomyocyten (Bueno et al. Circulation Research. 2001;88:88-96). De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC/MI operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. De dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen, en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

In geval de dieren een operatie ondergaan (minipompimplantatie, TAC of MI) krijgen de dieren peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS.

Alle dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren. In het geval van het gebruik van virale vectoren is het ongerief door kandidaat molecuul manipulatie vooraf niet in te schatten. In het geval van het gebruik van transgene dieren is het ongerief voorafgaand aan de proef geregistreerd.

-Angiotensine II / TAC /MI/CVB3/PE worden toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC en MI operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-een PE injectie veroorzaakt een acute steiging in bloeddruk en kan gepaard gaan met hoofdpijn en duizeligheid.

-Hoogvetdieet: het vet in de voeding kan de vacht vettig maken. Het zelfverzorgend gedrag van de dieren zal dus nauwlettend in het oog worden gehouden. De muizen die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen pre-diabetes symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte en verminderde fysieke gezondheid.

-CVB3 veroorzaakt in bepaalde muizenstammen gastro-intestinale klachten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) en MI induceren beide een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

PE veroorzaakt acute hypertensie met bovenbenoemde symptomen.

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetes staat in de muizen.

Virale myocarditis gaat gepaard met een sterke ontstekingsreactie in het hart die hartfalen veroorzaakt.

Daarnaast is CVB3 is een enterovirus met gastrointestinale effecten.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC/MI operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en 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.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC/MI / CVB3 infectie al dan niet in combi met hoog vet dieet, gepaard met moeilijk ademen en apathie. De mate van ongerief wordt ingeschat op basis van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.
- Koorts en dehydratie ten gevolge van CVB3 infectie.
- Neonatale pups: geen melkspot/ verstoten uit nest.
- Ernstige huidproblemen als gevolg van hoog vet dieet.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren.

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	4	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db ^{-/-} muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Kandidaat niet-coderende RNA moleculen die een rol blijken te hebben in het ontwikkelen van hartfalen in een pre-diabetes model (angII/TAC + hoog vet dieet), zullen nader onderzocht worden in een meer vergevorderd diabetes model. Hiervoor maken we gebruik van transgene db^{-/-} muizen. Deze muizen zijn een geaccepteerd en goed bestudeerd model voor obesitas en type 2 diabetes. De muizen presenteren zich met diabetische symptomen die een leeftijdsgebonden progressie volgen, wat ook wordt gezien in patiënten met het diabetes. Daarnaast wordt in deze muizen ook een vroege insuline resistentie gedetecteerd dat resulteert in hyperglycemia. Db^{-/-} muizen worden gebruikt voor het bestuderen van cardiale gevolgen van diabetes, zoals diabetische cardiomyopathie.

Om de rol van de kandidaat moleculen te bestuderen in het metabole syndroom (diabetes, obesitas en hypertensie), worden de db^{-/-} muizen blootgesteld aan drukoverbelasting door AngII infusie of TAC operatie. Dit zal een meer klinisch relevant beeld geven van de patiënten die zich presenteren met het metabole syndroom in de kliniek.

De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van Angiotensine II en daarom volstaat een meting middels tail cuff.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis zal gebeuren door de injectie van een korte DNA sequentie (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde

virale vector).

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.

Het dier zal een aantal behandelingen ondergaan:



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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groeps grootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen (mannelijk en vrouwelijke) met een Db-/- achtergrond en controle db^{+/+} muizen. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 160 muizen te gebruiken (40 per experimentele groep; 20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie). Het aantal experimentele groepen per experiment is 4:

In 5 jaar tijd zullen maximaal 16 kandidaat moleculen onderzocht worden met deze methode. In totaal wordt er dus geschat zo'n **2560 muizen** nodig te hebben.

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen van WT drachtige moeders of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruikt wordt van neonatale muizen voor de injectie van het virus, wordt pas met angiotensine II begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud).

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: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoïden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoïden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, *in vitro* experimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groepsgrootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige model is een redelijk verfijnd model om het metabole syndroom te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken en de muizen spontaan obesitas en diabetes ontwikkelen. Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken. Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC operatie uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. Alle dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren krijgen peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS. De dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren door de genmanipulatie. Dit is vooraf niet in te schatten.

-AngII/TAC wordt toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken of slecht helen tgv diabetes. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-db^{-/-}: Deze dieren ontwikkelen diabetische symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie, polydipsie, slechte wondheling en verminderde fysieke gezondheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) induceert een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

Db^{-/-} knockout induceert obesitas en diabetes.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten. Diabete muizen krijgen aangepaste verzorging/ huisvesting passend bij het ziektemodel.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en 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.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC, gepaard met moeilijk ademen en apathie.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren. Db^{-/-} muizen ervaren ernstige immobiliteit als gevolg van ernstig overgewicht en diabetes. Mate van ongerief wordt o.a. bepaald aan de hand van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

DEC-advies PV 2016-007/ [REDACTED]

Preambule:

De vragen en de bijbehorende antwoorden, genummerd: 3.2 Doel, vraag 2 en antwoord daarop doen wij U vertrouwelijk toekomen indachtig op artikel 10 lid 1 aanhef en onder f en g van de Wet Openbaarheid van Bestuur.

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen.*
3. **Titel van de NTS:** *Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC: *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC; 19-01-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken; 27-01-2017
 - 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 IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum; 03-02-2017

- **Gestelde vragen en antwoorden:**

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Vraag:

1. U geeft aan dat hyperaldosteronisme bij muizen leidt tot cardiale fibrosering. In hoeverre is bij de mens wetenschappelijk onderbouwd dat aldosteron c.q. hyperaldosteronisme leidt tot (analoge) cardiale fibrosering?

Antwoord:

Ik verwijs naar een review van Patel en Mehta (2012) waarin de rol van het renine-angiotensine-aldosteron systeem in diabetes en cardiovasculaire ziektes wordt beschreven. Hierin wordt duidelijk dat zowel angiotensine II (in dit PV als model gebruikt) als aldosteron cardiale fibrosering kunnen veroorzaken. Er is een recente review verschenen waarin wordt gesteld dat simultane inhibitie van RAAS componenten, inclusief aldosteron en angiotensine II, cardiale fibrosering verlaagt in patiënten met diabetes en hypertensie (Uijl E et al. From ARB to ARNI in Cardiovascular Control. Curr Hypertens Rep. 2016 Dec;18(12):86). In ons muismodel is angiotensine II-behandeling voldoende om cardiale fibrosering te veroorzaken.

3.2 Doel

Vraag:

1. Om de rol van miRNA en lncRNA te onderzoeken wordt o.a. gebruik gemaakt van antagomiR constructen. De DEC-UM vraagt zich af welke effecten deze hebben na toediening op het totale organisme en of deze effecten daarom een indirecte invloed hebben op het hartweefsel.

Antwoord:

Het doel van het project is om de rol van niet-coderende RNA moleculen in hartfalen te onderzoeken in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabetes/hypertensie/metabool syndroom). Niet-coderende RNA moleculen kunnen buiten het hart ook processen in het lichaam beïnvloeden die tot hartfalen leiden, zoals de functie van de perifere vaten.

[Redacted text block]

3. U schrijft onder het kopje ‘samenhang’ dat “microvasculaire dysfunctie leidt tot ontsteking door verhoogde permeabiliteit van de vaten”. Is verhoogde vaatpermeabiliteit niet juist een gevolg van de ontsteking? En de ontsteking een gevolg van activatie van het endotheel?

Antwoord:

De tekst is aangepast in:

Microvasculaire dysfunctie en ontsteking hebben een wisselwerking op elkaar; het door het metabole syndroom geactiveerde endotheel trekt ontstekingscellen aan, en op zijn beurt verhoogt ontsteking de permeabiliteit van de vaten.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Vraag:

1. De strategie omschrijft duidelijk de verschillende fases van het onderzoeksproject (*in vitro* tot patiënt). De DEC-UM vraagt om duidelijker aan te geven bij welke fase van het onderzoeksproject proefdieren noodzakelijk zijn. Verder vraagt de DEC-UM om de fase diermodellen duidelijker uit te werken met go/no-go beslismomenten op basis van de vraagstelling.

Antwoord:

In het PV, paragraaf 3.4.1, is nu per stap aangegeven of er nieuwe dierproeven nodig zijn, bijvoorbeeld als volgt: “Voor deze eerste stap van het onderzoek zijn derhalve geen dierproeven nodig”. Go/no-go beslismomenten zijn nu aangegeven in paragraaf 3.4.3 van het PV.

2. Op welke basis wordt verwacht om tot 20 kandidaatgenen te komen vanuit de 60 screened genen?

Antwoord:

In het PV hebben we geprobeerd dit als volgt te verduidelijken:

We schatten in zo'n **20 kandidaatgenen** te kiezen naar aanleiding van resultaten uit bovenstaande *in vitro* experimenten, om deze in stap 3) *in vivo* te bestuderen. Dit aantal is een schatting gebaseerd op 1) ervaring met het valideren van grootschalige genexpressie data, die in de praktijk in $\pm 70\%$ van de genen worden bevestigd, 2) het daarop volgende uitgebreide literatuuronderzoek om uit te sluiten dat de rol van een kandidaatgen al door andere onderzoekers wordt onderzocht, en 3) onze ervaring met het pre-valideren van de functies van kandidaatgenen middels *in vitro* celexperimenten, waaruit blijkt dat een klein deel van de kandidaatgenen geen actieve rol spelen in hartfalen processen.

3. Wat is de relevantie van viraal hartfalen voor metabool syndroom-hartfalen?

Antwoord:

We verwijzen graag naar het antwoord op vraag 2 bij punt 3.2 Doel.

4. Bij ‘validatie’: Hoe relevant is het bestuderen van moleculaire processen in neonatale primaire cellen ten opzichte van het ontwikkelen van hartfalen in volwassenen?

Antwoord:

Er zijn voor- en nadelen aan het gebruik van neonatale cellen voor de bestudering van “volwassen” hartfalen processen (Louch et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Sep; 51(3): 288–298). Voordeel is dat hartfalen in feite deels een herprogrammering van cardiomyocyten is richting neonatale genexpressie, wat dit model zeer representatief maakt. Aan de andere kant zijn deze cellen nooit volwassen geweest, dus ondergaan geen herprogrammering. Neonatale hartspiercellen zijn door hun relatieve toegankelijkheid (gemak van isolatie) en gemak om mee te kweken het meest gebruikte en geaccepteerde *in vitro* model van hypertrofie en hartfalen, zodat hier veel kennis over is.

Bovenstaande is als nabeschouwing (NB) toegevoegd aan paragraaf 3.4.1 bij punt 2) “validatie in historische samples en *in vitro* modellen”.

3.4.2

Algemene opmerking:

1. Niet alleen NSAIDs interfereren met ontsteking: er zijn aanwijzingen dat andere soorten pijnstillers (bv. opioïden) dit ook doen.

Dit is de reden dat in reuma-onderzoek bijvoorbeeld nooit pijnstilling mogelijk is. De DEC-UM adviseert U daar rekening mee te houden. Wellicht is het beter om op grond hiervan geen pijnstilling te gebruiken in de dieren waar ontsteking verwacht en gewenst wordt. Wanneer U hiervoor kiest, zult U ook de humane eindpunten scherper moeten omlijnen voor deze dieren.

Antwoord:

Dit is een belangrijk punt. De tekst in het PV is aangepast in:

Omdat NSAID's en opioïden interfereren met ontsteking, zal in geval dat ontsteking een primaire uitkomstmaat is, afgeweken worden van de GV SOLAS richtlijnen voor pijnbestrijding en geen analgesie toegepast worden. In dat geval worden de humane eindpunten nog scherper omlijnd.

Vragen:

1. De DEC-UM vraagt om duidelijker te omschrijven waarom de verschillende muizenmodellen noodzakelijk zijn. Aangezien de doelstelling aangeeft om meerdere risicofactoren te combineren en tevens de 5 pathofysiologische processen mee te nemen, lijken de muismodellen AngII + hoog vet dieet en TAC + hoog vet dieet de meest aangewezen modellen. Zie ook tabel 2.

Antwoord:

Zowel de bestudering van combinaties van risicofactoren als individuele risicofactoren in diermodellen is klinisch relevant; niet alle patiënten hebben dezelfde combinatie. Beide benaderingen zijn bovendien noodzakelijk om de exacte rol van kandidaatgenen te bepalen, bijvoorbeeld omdat drukoverbelasting en diabetes tegengestelde effecten kunnen hebben op cardiomyocyt metabolisme. Het is belangrijk te bepalen welke (combinatie van) risicofactoren welke moleculaire gevolgen heeft die worden bepaald door het kandidaatgen. De keuze voor een specifiek model zal afhangen van de combinatie van data die voortvloeit uit het historisch en in vitro onderzoek. Hiervan hebben we additionele voorbeelden gegeven in paragraaf 3.4.3. bij de keuzemomenten.

2. Zou het niet beter zijn om de kansrijke kandidaten eerst te bestuderen in het diabetesotensiemodel? U weet als het goed is in dit stadium al waar de miRNAs op inwerken en dus zou het testen in minder diermodellen kunnen plaatsvinden?

Antwoord:

Het doel zal altijd zijn het testen in zo min mogelijk dieren te laten plaatsvinden. We zijn het eens met uw constatering dat in dit stadium bekend is waar de miRNAs op inwerken en verwijzen graag naar het antwoord op vraag 1 van deze paragraaf.

3.4.4

Appendix 1

Algemene opmerkingen:

1. De DEC-UM vraagt zich af waarom gekozen wordt voor rat cardiale myocyten en niet voor muis, aangezien de diermodellen verder in de aanvraag allemaal muis zijn.

Antwoord:

Hartcellen uit rat en muis zijn vergelijkbaar. De keuze voor rat is gebaseerd op onze ervaring met deze cellen (>10 jaar), en op het feit dat er uit rattenharten meer cellen gehaald worden dan uit muizenharten.

2. Hoe wordt eigenlijk de experimentele conditie hartfalen opgewekt bij cardiomyocyten *in vitro*?

Antwoord:

De cardiomyocyten worden blootgesteld aan hypertrofe stimuli, inclusief endotheline 1 en phenylephrine, die inwerken op de belangrijkste pro-hypertrofe receptoren, respectievelijk de GPCRs en adrenerge receptoren. Deze stimuli veroorzaken de activatie van hypertrofe genexpressie, waaronder de natriuretische peptiden BNP en ANF, die ook klinisch hartfalen kenmerken.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Kunt U nader toelichten waarom bij de winning van cardiomyocyten bij hoog vet dieet enkel mannelijke dieren worden gebruikt en voor het overige dieren van beide geslachten?

Antwoord:

Bij de winning van alle adulte cardiomyocyten (niet enkel de dieren op hoog vet dieet) wordt gebruik gemaakt van enkel mannelijke dieren, omdat het doel van deze proeven is de bepaling van de rol van kandidaatgenen in cardiomyocyt metabolisme. Omdat estrogeen hierop van invloed zijn, kiezen we voor mannelijke dieren.

Om te verduidelijken dat het om alle adulte dieren gaat, zijn we voor dit deel van de paragraaf een nieuwe alinea gestart.

C. Hergebruik.

2. De DEC-UM vraagt om te overwegen de moederdieren te hergebruiken voor volwassen myocyt isolatie. Kan er een interne fok opgezet worden zodat moederdieren meerdere nesten kunnen werpen?

Antwoord:

We verwijzen graag naar het antwoord op vorige vraag. Moederdieren zijn daarenboven hormonaal nog meer belast dan niet-zwangere vrouwelijke dieren.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

3. De DEC-UM vraagt zich af of een eerste reductie in kandidaatgenen mogelijk is op basis van geïmmortaliseerde cellijnen ondanks hun beperkingen.

Antwoord:

Geïmmortaliseerde cellijnen zijn met name bruikbaar bij het beantwoorden van specifieke subvragen die inzoomen op een moleculair proces, en waarbij bekend is dat de cellijnen hiervoor geschikt zijn. Bijvoorbeeld kunnen H9C2 cellen gebruikt worden voor het bestuderen van autofagie, een van de vele subprocessen van hartfalen. Hiertoe moeten hypothese en in vivo rol van het kandidaatgen reeds verder uitgekristalliseerd zijn. Helaas zijn de cellijnen niet geschikt om "hartfalen" op celniveau te bestuderen, en dit is wel nodig voor besluitvorming of een kandidaatgen verder bestudeerd moet worden in diermodellen.

E. Herhaling.

4. Hoe ondervangt U eventuele duplicatie.

Antwoord:

We hebben de suggestie als volgt verwerkt in alle appendices in de tekst bij E. Herhaling: Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

K. Classificatie van ongerief.

5. De appendix omvat geen normaal vet dieet gevoede ratten. Het lijkt dat Hoog vet dieet gevoede ratten ook een terminaal experiment is. De DEC-UM verzoekt het normale vet dieet nader te omschrijven.

Antwoord:

Het normale vet dieet is net als het hoog vet dieet een synthetisch dieet. Het reguliere “chow” dieet is niet synthetisch zodat de inhoud van dit dieet niet gematcht is met die van het hoog vet dieet. Matching op inhoud van dieet is belangrijk, omdat enkel de aanwezigheid van vetten in het dieet verschillend dient te zijn.

De appendix was inderdaad incompleet, en is nu aangevuld met een groep ratten die, naast de hoog vet dieet gevoerde ratten, een normaal vet dieet krijgen. Deze aanpassingen zijn in grijs gemarkeerd in paragrafen A, B en I. Ons inziens blijft de classificatie van de normaal vet dieet gevoerde ratten “terminaal”, omdat dit dieet geen ongerief veroorzaakt.

Appendix 2

Algemene opmerking:

1. De DEC-UM vraagt zich af of splenocytes ook kunnen gebruikt worden voor de isolatie van immuuncellen, waardoor minder dieren nodig zijn.

Antwoord: dit is helaas niet mogelijk, omdat 1) de overgrote meerderheid immuuncellen in de milt uit B cellen bestaat, en 2) de minderheid aan monocyt/macrofagen die uit de milt worden geïsoleerd al ver doorgedifferentieerd zijn. Beenmergcellen hebben als voordeel dat ze in kweek sterk vermeerderd kunnen worden terwijl ze differentiëren richting macrofaag.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. **App 2-3 en 4:** Waarom wordt de huid gekliefd middels knippen i.p.v. snijden?

Antwoord:

Zo wordt dit in de goedgekeurde SOPs voorgesteld.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

2. **App 1 t/m 7:** De DEC-UM vraagt zich af wat de zo humaan mogelijke wijze van opoffering inhoudt.

Antwoord:

Dit is een overbodige zin want het spreekt voor zich dat de opoffering van dieren op humane wijze gebeurt, dit wil zeggen zonder dat het dier dit merkt. De zin is verwijderd uit de appendices.

Appendix 3

Algemene opmerkingen:

1. **App 1 t/m 7(waar van toepassing):** In de laatste alinea van A wordt gemeld dat de formule van Sachs wordt gebruikt om de groeps grootte te berekenen, terwijl in B de groeps grootte nu al bekend lijkt. Kunt U dit toelichten? De DEC-UM vraagt zich af of er een inschatting kan gegeven worden van de spreiding en het verwachte verschil.

Hoeveel dieren worden er maximum per groep verwacht en welke onderbouwing wordt hiervoor gehanteerd? Kan uitval gespecificeerd worden?

Antwoord:

De gegeven aantallen zijn een schatting op basis van onze historische ervaring.

Per experiment zal in een later stadium het definitief benodigde aantal dieren berekend worden met de formule van Sachs, zodra per gen en op basis van de eerdere (in vitro) experimenten de spreiding en het verwachte verschil bekend zijn. Ook kan uitval dan gespecificeerd worden.

In de appendices is dit als volgt aangepast:

- onder A:

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening o.b.v. de formule van Sachs om de definitieve groepsgrootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

- onder B:

Per experimentele groep schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 40 muizen te gebruiken (20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecul expressie).

Vraag:

Waarom 80 x 6 en niet 80 x 10 bij 10 kandidaat moleculen? Hoe verloopt de berekening van de groepsgrootte en hoe is eventuele uitval verdisconteerd?

Antwoord:

De gegeven aantallen zijn schattingen van het maximum aan dieren; eventuele uitval is hierin meegenomen maar deze kan pas definitief vastgesteld worden per gen na het uitvoeren van de voorafgaande (in vitro) experimenten. Omdat het om schattingen gaat voor het maximaal benodigde aantal dieren, en de verschillende experimentele aanpakken nu in 1 appendix worden samengenomen, is besloten om de weergave van de maximum aantallen in appendix 3 en 4 te vereenvoudigen. We gaan nu uit van maximaal 4 experimentele groepen per experiment per kandidaatgen, en hebben de aantallen hierop berekend. Pas bij het bekend worden van de experimentele aanpak o.b.v. de eerste in vitro experimenten kunnen aantallen definitief worden berekend in werkprotocollen.

Vraag:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Uitleg noot 1 en 2 ontbreekt.

Antwoord:

Uitleg is toegevoegd en grijs gemarkeerd.

Appendix 5

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Kunt U het waarom van de drie genoemde tijdsmomenten ter bestudering van het ziekteverloop nader onderbouwen?

Antwoord:

Er is nu gekozen om de experimentele aanpak uit appendix 5 pas in stap 4, de tweede in vivo validatiestap, uit te voeren. Op dat moment is duidelijk welk tijdsmoment na CVB3 infectie we willen bestuderen, afhankelijk van welke primaire uitkomstparameter naar voren komt uit stap 3, de eerste in vivo validatie stap. De experimentele aanpak uit appendix 5 is nu geïncorporeerd in appendix 3.

B. De Dieren.

2. In appendix 3 worden 10 kandidaatgenen onderzocht. Hier wordt aangegeven dat dit 15 kandidaatgenen zijn.

De DEC-UM gaat ervan uit dat in beide diermodellen dezelfde genen getest worden.

Indien dit niet zo is, graag een duidelijke onderbouwing. Welk aantal dieren is correct?

Antwoord:

Na het opnieuw bepalen van het stappenplan is besloten in stap 4, waarbij ook CVB3-infectie hoort, maximaal 16 kandidaatgenen te onderzoeken.

Zonder de resultaten van de historische en *in vitro* vooronderzoeken (stappen 1 en 2) kunnen we slechts gissen naar het aantal genen dat betrokken blijkt te zijn bij ontsteking, relevant voor het CVB3 experiment. Bij de huidige berekeningen gaan we er daarom van uit dat alle kandidaatgenen die door de eerste *in vivo* validatie in stap 3) komen een rol in ontsteking blijken te spelen. In werkelijkheid zullen deze aantallen lager liggen, maar hierover zijn voorafgaand aan het completeren van stappen 1) en 2) geen uitspraken te doen. De aantallen zijn aangepast en grijs gemarkeerd in appendix 3 onder B en in de tabel in K.

De aantallen zijn ook aangepast en grijs gemarkeerd in de NTS:

Muizen: totaal 18848 (100%)

1. terminaal experiment: 288 (2%)

3. ongerief is matig: 17920 (95%)

4. ongerief is ernstig: 640 (3%)

J. Humane eindpunten.

3. Misstaan koorts en dehydratie (ten gevolge van diarree) hier niet daar het een enteraal virus betreft?

Antwoord:

Dit is correct, nu toegevoegd aan J in appendix 3:

Koorts en dehydratie ten gevolge van CVB3-infectie.

Appendix 6

Vraag:

E. Huisvesting en verzorging.

1. Wat is aangepaste huisvesting van dieren met diabetes mellitus?

Antwoord:

Er wordt aangegeven dat de dieren geen aangepaste huisvesting nodig hebben. Wel drinken dieren met diabetes mellitus extra veel, en zullen de waterflessen mogelijk vaker worden bijgevuld.

Appendix 7

Vraag:

B. De Dieren.

1. Deze bijlage beschrijft een dierproef met het meest ernstige ongerief. Op basis van alle voorgaande dierexperimenten zou bijvoorbeeld een drietal miRNA's uit de bus kunnen komen als meest veelbelovend.

Waarom bent U voornemens hier weer 10 kandidaatgenen te testen en niet bijvoorbeeld de drie meest veelbelovende? Hetzelfde zou gezegd kunnen worden *mutatis mutandis* over de vorige bijlage waar ook maar liefst 10 kandidaatgenen worden getest. Kunt U de groepsgrootte van 25 dieren in deze bijlage nader onderbouwen.

Antwoord:

We gaan ervan uit dat 16 van de 20 kandidaatgenen in de eerste ronde *in vivo* experimenten (stap 3 en bijlage 3) een rol blijken te spelen in hartfalen, en daarom verder onderzocht worden in deze tweede ronde (stap 4 en bijlage 4).

Deze kans is reëel, omdat het vooronderzoek met historische monsters en *in vitro* experimenten gedegen is, en in het verleden heeft uitgewezen tot een goede kandidaatgenselectie te leiden. De geschatte groepsgrootte is op 20 gezet voor alle experimenten.

- Datum antwoord; 01-03-2017
- Verstreckte antwoorden; *Zie hierboven*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts: **N.V.T.**

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. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
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. **N.V.T.?**

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 doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop 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-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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).

Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek

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 van het project is om de rol van niet-coderendeRNA moleculen in hartfalen te onderzoeken in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabetesotensie/metaboolsyndroom).

Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen.

Het betreft hier een fundamenteel en translationeel project.

Er is binnen dit project wel een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het 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 hartfalen op dit moment nog beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. De DEC-UM is van mening dat het directe doel, het onderzoeken van de rol van niet-coderendeRNA moleculen in hartfalen in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabetesotensie/metaboolsyndroom), gerechtvaardigd is 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 fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen (HfpEF), zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. personen die hartfalen ontwikkelen en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen verschillende categorieën ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over de pathofysiologische processen die bijdragen aan de ontwikkeling van HfpEF. Daardoor wordt het mogelijk nieuwe therapeutische targets te identificeren en tracht men te komen tot effectieve behandelwijzen met "therapie-op-maat".

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Verbeterde therapie en vergrote levensverwachting. Daardoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Hartfalen is in Nederland een belangrijke oorzaak van overlijden. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

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

Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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).

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

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).

De DEC-UM 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 doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in 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. **N.V.T.**
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.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen.

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).

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

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 integriteit van de dieren zal worden aangetast door: De experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven. Vrijwel alle dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

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*).

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

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 DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

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*).

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat.

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-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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.

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

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).

De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om in voorkomende gevallen de proeven met dieren van eenvormig geslacht uit te voeren.

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*).

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

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. **N.V.T.**

NTS

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

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen?"

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.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig tot ernstig nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van hartpatiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven grotendeels tot de dood na verschillende categorieën van ongerief: licht ongerief/matig ongerief/ernstig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot uitbreiding van de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen. Deze kennis is op dit moment nog beperkt, maar deze kennis is wel noodzakelijk voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden van hartfalen. In de kliniek is bij metabool hartfalen behoefte aan meer kennis en effectievere therapie. Hierdoor kan de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Metabool hartfalen (HfpEF) komt veel voor. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen?" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie en gedurende het project blijven de onderzoekers zich daarvan vergewissen.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning.

De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

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*).

N.V.T.

Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017924

Bijlagen

2

Datum 13 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 maart 2017. Het gaat om uw project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002017924. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

13 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

Datum:

13 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10700

Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 50169181

Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6

Postbus: 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

IBAN: NL04 INGB 0679 5101 68

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Datum:
13 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924

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 april 2017
Geplande einddatum: 1 april 2022
Titel project: Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen
Titel niet-technische samenvatting: Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.684,-
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: Maastricht
Datum: 13 maart 2017

Datum:
13 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017924

Bijlagen

2

Datum 13 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 maart 2017

Vervaldatum: 12 april 2017

Factuurnummer: 170924

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017924	€ 1.684,00

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

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017924

Datum 22 maart 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" met aanvraagnummer AVD107002017924. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- 1) U beschrijft het ongerief van de dieren die zonder voorbehandeling worden gedood als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlages dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen? Indien eerst organen/cellen worden geïsoleerd en de dieren pas daarna worden gedood graag zo in de aanvraag vermelden.
- 2) U beschrijft in de bijlage dierproeven 1 onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden. Zou het niet mogelijk zijn om 1-2 pups bij de moeder in het nest achter te laten zodat ze geen extra ongerief ervaren? Dan zouden deze dieren niet als dierproef worden gezien. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren inderdaad drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?
- 3) In bijlage dierproeven 1 schrijft u op pagina 1 onder A., Volwassen rat

cardiale myocyten: 'Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd.' Op pagina 2 onder B., Volwassen rat cardiale myocyten staat: 'Wij hebben gekozen om alleen experimenten te doen met mannelijke ratten om daarmee de effecten van estrogeen uit te sluiten.' Zou u de bijlage willen aanpassen met de juiste informatie?

Datum:
22 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924

4) In de NTS staat dat 2832 ratten worden ingezet waarvan 720 volwassen ratten. Echter komen we op 2952 ratten waarvan 840 (600+240) volwassen ratten uit bijlage 1. Zou u het aantal volwassen ratten willen nakijken en aanpassen?

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. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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 Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Universiteit Maastricht

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD107002017924

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:

22 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

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

24 APR 2017

Aan: **Centrale Commissie Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Uw kenmerk

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht

05-04-2017

Betreft: Reactie op Uw schrijven dd.29-03-2017/PV AVD107002017924.

Geachte [REDACTED], geachte Commissie,

In reactie op Uw brief van 29 maart j.l. hebben wij de beschrijving van het ongerief van de dieren gespecificeerd in zowel het projectvoorstel als de betreffende bijlagen 3 en 4.

In het projectvoorstel leest dit nu als volgt:

Peri-operatieve pijnbestrijding wordt altijd toegepast volgens de GV SOLAS richtlijnen. Echter, omdat NSAID's en opioïden interfereren met ontsteking, zal in geval dat ontsteking een primaire uitkomstmaat is, in de laatste week van de studie afgeweken worden van de GV SOLAS richtlijnen in geval pijnbestrijding om andere redenen geïndiceerd is, bijvoorbeeld vanwege een ontstoken wondje. In dat geval worden dieren waar nodig voortijdig opgeofferd volgens het protocol, waarbij alle primaire uitkomstparameters worden bepaald. Ontstoken wondjes treden zelden op, in max ±1% van de dieren.

In de bijlagen 3 en 4 leest dit nu als volgt:

*In geval de dieren een operatie ondergaan (minipompimplantatie, TAC of MI) krijgen de dieren peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS. Alle dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet. In het geval een van de primaire uitkomstparameters "ontstekingsrespons" is en het afwijkende gedrag wordt geobserveerd in de laatste week van de studie, zal **geen** pijnstilling/ontstekingsremming worden toegepast; in dit geval wordt het dier voortijdig opgeofferd volgens het protocol, waarbij alle primaire uitkomstparameters worden bepaald.*

Secretariaat

Bezoekadres

Maastricht

Postadres

Postbus 616
6200 MD Maastricht

Aan documenten waarin wijzigingen zijn aangebracht is in de titel 'R3'
toegevoegd. De wijzigingen zijn grijs gemarkeerd.

Hoogachtend,





Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. 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.

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

Metabool hartfalen, een complex ziektebeeld

Metabool hartfalen

Hartfalen met een behouden ejectie fractie, ook wel HFpEF en metabool hartfalen genoemd, is een groeiend klinisch en maatschappelijk probleem dat voortvloeit uit de risicofactoren horend bij een moderne levensstijl, samenvattend het metabole syndroom. Een kwart van de wereldpopulatie lijdt aan het metabole syndroom, waarbij de meerderheid een combinatie heeft van type 2 diabetes, obesitas en hypertensie, ook wel "diabetesotensie" genoemd (Sharabi 2012). De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de morbiditeit en mortaliteit van het metabole syndroom zijn 1) **microvasculaire (endotheel) dysfunctie**, 2) **ontsteking**, 3) **cardiomyocyt hypertrofie**, 4) **metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen** ten gevolge van o.m. insuline resistentie en hypertensie, en eindorgaanschade met 5) **bindweefselafzetting/fibrose** in bijvoorbeeld het hart (Aroor 2013, Schroen 2012). Deze 5 pathofysiologische processen leiden uiteindelijk tot hartfalen, waarbij er hoofdzakelijk hartfalen met behouden ejectiefractie (HFpEF) ofwel "metabool hartfalen" wordt gezien (Paulus 2013). Een van de belangrijkste kenmerken van HFpEF is diastolische dysfunctie, oftewel een stijf hart dat moeilijk ontspant (Paulus 2013).

Immuunsysteem

In welke mate het immuunsysteem en externe pathogenen bijdragen aan hartfalen al dan niet in combinatie met bovenstaande risicofactoren is nog onbekend. Recent vond onze groep dat virale aanwezigheid in het hart, van relatief onschuldige verkoudheids- en enterovirussen zoals parvovirus B19 en coxsackievirus B3, in combinatie met andere risicofactoren de prognose van hartfalen patiënten verslechtert (Hazebroek 2015).

Ook is de overleving en hartfunctiebehoud na een myocardinfarct steeds beter door betere en snellere behandelingen. Echter, de 5 pathofysiologische processen van HFpEF spelen in het hart na het overleven van een myocardinfarct ook een centrale rol, en ook hier is het onbekend wat de interactie is tussen het geactiveerde immuunsysteem na een myocardinfarct en de aanwezigheid van diabetesotensie. Zowel de infectie met relatief onschuldige virussen als het overleven van een myocardinfarct kunnen als additionele risicofactoren voor hartfalen worden beschouwd, waarbij immunosuppressie mogelijk een belangrijke rol speelt.

Helaas kan de cardioloog een patiënt met HFpEF – in tegenstelling tot iemand met hartfalen met verlaagde ejectiefractie – geen effectief geneesmiddel aanbieden, waardoor de levenskwaliteit van HFpEF patiënten sterk verlaagd wordt en de mortaliteit wereldwijd exponentieel toeneemt met de groeiende obese en oudere populatie (Nanayakkara S 2015, Horgan 2014). Om een betere behandeling van HFpEF mogelijk te maken is er kennis nodig van de onderliggende pathofysiologische en moleculaire processen, waaronder de (relatieve) bijdragen en interacties van bovengenoemde 5 processen in de diverse organen en systemen die aangedaan zijn tijdens het metabole syndroom, zoals hart, lever, nieren, longen, het zenuwstelsel, het vetweefsel, de pancreas en de skeletspieren.

Huidige stand van zaken

Het is bekend dat de 5 pathofysiologische processen die hierboven beschreven staan, allen bijdragen aan de ontwikkeling van HFpEF. Echter, de (combinatie van) risicofactoren die bijdragen aan de ziekte verschillen per patiënt. Het falen van de vele klinische trials waarbij HFpEF als 1 ziekte werd beschouwd (Nanayakkara 2015), onderstreept het belang van patiënten stratificatie om te komen tot effectieve behandelwijzen met "therapie-op-maat". De cardioloog heeft te maken met 2 problemen: 1) wat is de impact van de diverse risicofactoren en hiermee gepaard gaande pathofysiologische processen op het ziekteverloop in HFpEF patiënten?, en 2) welke therapie-op-maat kan worden aangeboden? Er is grote behoefte aan nieuwe therapeutische targets, die er alleen kunnen komen als er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen (Nanayakkara 2015). Dit project heeft als doel meer inzicht te verkrijgen in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en daarmee nieuwe therapeutische targets te identificeren. Onze groep maakt zich daarnaast sterk om de HFpEF patiëntenpopulatie te helpen stratificeren in samenwerking met cardiologen, radiologen en fysiologen.

Schematisch

Diabetesotensie/ metabool syndroom ± immunosuppressie >>> pathofysiologische mechanismen (in

willekeurige volgorde: cardiale microvasculaire dysfunctie, ontsteking, cardiomyocyt hypertrofie, metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen, en bindweefselvorming) >>> HFpEF/metabool hartfalen

Niet-coderende RNA moleculen spelen belangrijke rollen in pathofysiologische processen

De helft van het zoogdierenenoom bestaat uit niet-eiwit-coderende genen. De hieruit voortkomende niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs" (lncRNAs), spelen een rol in alle (patho)biologische processen, ook in processen die leiden tot hartfalen (Schroen 2012). Recent heeft ons lab bijvoorbeeld aangetoond dat het niet-coderende [REDACTED] tijdens hypertensie de ontstekingsrespons van het hart controleert en bijdraagt aan de ontwikkeling van humaan en muis hartfalen (Heymans 2013). Ook zijn specifieke lncRNAs gevonden met een role in humaan en muis hartfalen (Ounzain 2015). Echter, de rol van niet-coderende RNA moleculen, waaronder [REDACTED], in de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan HFpEF is grotendeels onbekend. Om te komen tot nieuwe inzichten in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en de identificatie van nieuwe therapeutische targets, zal dit project zich daarom richten op de rol van niet-coderende RNA moleculen.

Translationeel potentieel:

Niet-coderende RNA moleculen vormen een even grote groep genen als de eiwit-coderende genen. Niet-coderende RNA moleculen zijn relatief makkelijk te remmen met specifieke medicijnen (bv "antagomirs"), waarvoor de eerste klinische trials al lopen. Het feit in aanmerking nemend dat voor de grote en groeiende groep HFpEF patiënten nog geen therapie beschikbaar is, biedt het exploreren van de rol en mogelijkheden van deze grote groep genen een ongekend therapeutisch potentieel.

Relevante referenties:

- [REDACTED]
- Sharabi Y. Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (diabesotension). Diabetes/metabolism research and reviews 2012
 - Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. Metabolism: clinical and experimental. 2013;62:1543-1552
 - Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. J Am Coll Cardiol. 2013;62:263-271
 - Nanayakkara S, Kaye DM. Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review. Clin Ther. 2015 Oct 1;37(10):2186-98.
 - Horgan S et al. Murine Models of Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Journal of Cardiac Failure. 2014 Dec;20(12):984-95
 - Patel BM, Mehta AA. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. European journal of pharmacology. 2012;697:1-12
 - Schroen B, Heymans S. Small but smart--micrornas in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. Cardiovascular research. 2012;93:605-613
 - Hazebroek MR, Moors S, Dennert R, van den Wijngaard A, Krapels I, Hoos M, Verdonschot J, Merken JJ, de Vries B, Wolffs PF, Crijns HJ, Brunner-La Rocca HP, Heymans S. Prognostic Relevance of Gene-

Environment Interactions in Patients With Dilated Cardiomyopathy: Applying the MOGE(S) Classification. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Sep 22;66(12):1313-23

- Ounzain S, Micheletti R, Beckmann T, Schroen B, Alexanian M, Pezzuto I, Crippa S, Nemir M, Sarre A, Johnson R, Dauvillier J, Burdet F, Ibberson M, Guigó R, Xenarios I, Heymans S, Pedrazzini T. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. *Eur Heart J*. 2015 Feb 7;36(6):353-68a.

[Redacted text block]

- Samir Ounzain, Rudi Micheletti, Tal Beckmann, Blanche Schroen, Michael Alexanian, Iole Pezzuto, Stefania Crippa, Mohamed Nemir, Alexandre Sarre, Rory Johnson, Jerome Dauvillier, Frederic Burdet, Mark Ibberson, Roderic Guigo, Ioannis Xenarios, Stephane Heymans, Thierry Pedrazzini. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. **Eur Heart J**. 2015 Feb 7;36(6):353-68a.

- Respress JL1, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skårdal K, Wisløff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM, Dobrev D, Wehrens XH. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. **Circ Res**. 2012 May 25;110(11):1474-83.

-Orlando F. Bueno, Leon J. De Windt, Hae W. Lim, Kevin M. Tymitz, Sandra A. Witt, Thomas R. Kimball, Jeffery D. Molkenin. The Dual-Specificity Phosphatase MKP-1 Limits the Cardiac Hypertrophic Response In Vitro and In Vivo. **Circ Res** 2001;88:88-96.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het **doel** van het project is om de rol van niet-coderende RNA moleculen in hartweefselfalen te onderzoeken in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabesotensie/metabool syndroom). Niet-coderende RNA moleculen kunnen buiten het hart ook processen in het lichaam beïnvloeden die tot hartfalen leiden, zoals de functie van de perifere vaten.

De wetenschappelijke **hypotheses** die in dit PV worden getoetst zijn:

Niet-coderende RNA moleculen dragen bij aan de ontwikkeling van hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom door

- 1) en 2) Het reguleren van cardiomyocyt functie, waaronder 1) hypertrofie (celgroei) en 2) cel metabolisme, tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid;
- 3) Het reguleren van microvasculaire functie tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid;
- 4) Het reguleren van ontstekingsresponsen tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid;
- 5) Het reguleren van bindweefselvorming in het hart tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid.

Samenhang tussen hypothesen a-d

De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen, en die worden aangeschakeld door de risicofactoren horend bij het metabole syndroom, beïnvloeden elkaar. Microvasculaire dysfunctie en ontsteking hebben een wisselwerking op elkaar; het door het metabole syndroom geactiveerde endotheel trekt ontstekingscellen aan, en op zijn beurt verhoogt ontsteking de permeabiliteit van de vaten. Tegelijkertijd verlaagt microvasculaire dysfunctie de toevoer van voedingsstoffen en zuurstof naar de cardiomyocyt, leidend tot cardiomyocyt dysfunctie. Cardiomyocyt dysfunctie en ontsteking worden verergerd door verhoogde activatie van het renine-angiotensine-aldosteron systeem en het veranderde aanbod van circulerende suikers en vetzuren tijdens diabetes, en leiden tot apoptose van diverse celtypen en bindweefselvorming.

De **haalbaarheid** van het project wordt ondersteund door:

- a. De beschikbaarheid van diverse cel- en muizenmodellen van hartfalen binnen het instituut.
- b. De toegang tot fenotyperingsapparatuur en -expertise binnen het instituut, alsook de gevestigde moleculaire infrastructuur.
- c. De moleculaire en pathofysiologische achtergrond van de PI en haar integratie in de kliniek (staflid).

De beschikking over subsidiegelden van de PI die aan het doel van dit project besteed dienen te worden, en de expertise van de PI met diermodellen.

3.3 Belang

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

Hartfalen is een progressieve en ernstig invaliderende aandoening met een slechte prognose waarvoor geen therapie beschikbaar is anders dan symptoombestrijding. Volgens statistieken van de Nederlandse Hartstichting en het RIVM leven er in Nederland zo'n 200.000 mensen met hartfalen, waarvan de helft HFpEF heeft. De helft van de patiënten overlijdt binnen 5 jaar na diagnose, waarbij er voor de HFpEF populatie geen effectieve behandeling voorhanden is. Risicofactoren voor de ontwikkeling van HFpEF zijn hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas. Veel patiënten hebben een combinatie van deze risicofactoren (diabetes), maar zelden worden de risicofactoren tezamen bestudeerd. Tevens is over de progressie van prediabetes naar vergevorderd diabetes niet veel bekend, daarom worden modellen bestudeerd. Deze fundamentele en translationele studie zal bijdragen aan de opheldering van de mechanismen die leiden tot HFpEF, door de combinatie van hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas als uitgangspunt te nemen, en de rol van niet-coderende RNA moleculen te bestuderen die in deze condities geïmpliceerd zijn. Op termijn hopen we met de vergaarde kennis te helpen voorkomen dat mensen hartfalen ontwikkelen danwel hieraan overlijden. Dit is zowel sociaal als economisch van grote maatschappelijke relevantie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

1) Kandidaatgenen

Uit diverse reeds gecompleteerde screens voor identificatie van niet-coderende RNA moleculen betrokken bij processen die hartfalen beïnvloeden, zijn kandidaat moleculen voor *in vivo* bestudering geselecteerd:

- *in vitro* screen van 194 microRNAs, waarbij deze tot overexpressie zijn gebracht in cardiomyocyten, bindweefselcellen en ontstekingscellen (Verjans et al. ingediend). De readouts

van de respons van de cellen op de verhoogde expressie van de microRNAs zijn gerelateerd aan aspecten van de ontwikkeling van hartfalen, respectievelijk celgroei, bindweefselvorming en ontstekingsrespons.

- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in humane hartbiopten van mensen met hartfalen (waaronder HFpEF (ongepubliceerd) en viraal hartfalen (zie Corsten et al. Circ Res 2012)) en gezondere controles.
- Deep sequencing resultaten (ongepubliceerd) die expressie tonen van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in een ratten model van HFpEF.
- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in muizenmodellen van hartfalen (TAC, Angiotensine II en viraal hartfalen, zie bijvoorbeeld Cortsen et al. Circ Res 2012 en Ounzain et al. 2015).

We beschikken op dit moment over een lijst van **60 kandidaatgenen** die afkomstig zijn uit deze bestaande datasets. Voor deze eerste stap van het onderzoek zijn derhalve geen dierproeven nodig. Deze 60 kandidaatgenen zullen in stap 2) *in vitro* gevalideerd worden.

2) Validatie in historische samples en in *in vitro* modellen

Geselecteerde niet-coderende RNA kandidaten zullen **gevalideerd** worden in

- a) reeds verzamelde monsters van muizenharten, rattenharten en humane hartbiopten middels
 - a. expressie-analyses
 - b. geoptimaliseerde histologische en *in vitro* technieken (zie bvb Heymans 2013) ter bepaling van de bron van expressie (celtype)
Voor deze stap wordt gebruik gemaakt van historische monsters en zijn geen proefdieren nodig.
- b) de geïdentificeerde cellen van oorsprong ter bepaling van de moleculaire processen waarbij deze kandidaten betrokken zijn. Hiertoe worden cellen geïsoleerd uit proefdieren.

De te bestuderen moleculaire processen betrokken bij de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF en gerelateerd aan de 5 beschreven pathofysiologische processen zijn:

1. hypertrofie van cardiomyocyten
2. cardiomyocyt metabolisme
3. endotheelcel proliferatie en functie
4. ontstekingsparameters in elk cardiaal celtype, met name cardiomyocyten, endotheel- en ontstekingscellen
5. bindweefselvorming door fibroblasten

De bron van de te gebruiken cellen is deels cellijnen (cardiomyocyten, endotheelcellen, fibroblasten, ontstekingscellen), maar gezien de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun metabolisme en groei in deze cellen (zie bvb Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes) – processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen - is het van belang de processen ook in de volgende primaire cellen te bestuderen:


- Neonatale rat cardiomyocyten > bestudering van celgroei (oorsprong: wild type)
- Adulte rat cardiomyocyten > bestudering van metabolisme (oorsprong: wild type op controle dieet of hoog vet dieet)
- Neonatale rat cardiale fibroblast > bestudering van bindweefselvorming (oorsprong: wild type)
- Beenmergcellen geïsoleerd uit de muis die *in vitro* worden gedifferentieerd tot macrofaag > bestudering van ontstekingsrespons (oorsprong: wild type en transgene muizen)

NB. Het gebruik van neonatale cellen voor de bestudering van "volwassen" hartfalen processen heeft voor- en nadelen. Voordeel is dat hartfalen in feite deels een herprogrammering van cardiomyocyten is richting neonatale genexpressie, wat dit model zeer representatief maakt. Aan de andere kant zijn deze cellen nooit volwassen geweest, dus ondergaan geen herprogrammering. Neonatale hartspiercellen zijn door hun relatieve toegankelijkheid (gemak van isolatie) en gemak om mee te kweken het meest gebruikte en geaccepteerde *in vitro* model

van hypertrofie en hartfalen (Louch et al. J Mol Cell Cardiol. 2011 Sep; 51(3): 288–298).

We schatten in zo'n **20 kandidaatgenen** te kiezen naar aanleiding van resultaten uit bovenstaande *in vitro* experimenten, om deze in stap 3) *in vivo* te bestuderen. Dit aantal is een schatting gebaseerd op 1) ervaring met het valideren van grootschalige genexpressie data, die in de praktijk in $\pm 70\%$ van de genen worden bevestigd, 2) het daarop volgende uitgebreide literatuuronderzoek om uit te sluiten dat de rol van een kandidaatgen al door andere onderzoekers wordt onderzocht, en 3) onze ervaring met het pre-valideren van de functies van kandidaatgenen middels *in vitro* celexperimenten, waaruit blijkt dat een klein deel van de kandidaatgenen geen actieve rol spelen in hartfalen processen.

3) Onderzoek in diermodellen

Voor kandidaatgenen die de validatiestap hebben doorstaan zal de rol, waaronder de causale betrokkenheid, in de in punt 3.4.2 voorgestelde **dierenmodellen** van metabool syndroom en hartfalen worden onderzocht. In deze dierenmodellen zullen niet-coderende RNA moleculen gemanipuleerd worden middels remmende oligo's (antimiRs voor microRNAs en gapmers voor long non-coding RNAs), overexpressie met behulp van virale vectoren of mimics of door gebruik van transgene modellen (bvb  KO muizen). De diermodellen zullen in punt 3.4.2 in meer detail worden beschreven. Het besluit voor het soort diermodel wordt genomen o.b.v. de directe betrokkenheid van het kandidaatgen bij minimaal een van de 5 pathofysiologische processen, zoals beschreven in 3.4.3 (zie ook schematische weergave van de keuzemomenten bij punt 3.4.3). Bij een multifactoriële aandoening als HFpEF is het bijvoorbeeld mogelijk dat een kandidaatgen direct 1 pathofysiologisch proces beïnvloedt en indirect (meerdere) andere.

4) Valorisatie

De resultaten zullen in internationale peer-reviewed wetenschappelijke tijdschriften worden gepubliceerd. Er zal bekeken worden hoe de data in een patent verwerkt kunnen worden. Omdat de geselecteerde targets obv hun expressiepatroon ook een rol lijken te spelen in humaan hartfalen, kan snel de stap worden gezet richting klinische translatie, waarbij de korte lijnen met de kliniek aangesproken zullen worden. In samenwerking met partners van de farmaceutische industrie zullen therapeutische targets in een groter proefdiermodel van hartfalen worden onderzocht, als eerste stap richting klinische toepassing.

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

Onderstaande diermodellen (**Tabel 1**) zijn gekozen obv hun relevantie voor het bestuderen van hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom of de individuele componenten vallend onder het metabole syndroom; diabetes, obesitas, hypertensie en virale aanwezigheid (Horgan 2014; Hazebroek 2015). Elk diermodel zal een bijdrage leveren aan het begrip van de onderliggende pathofysiologische mechanismen die tot hartfalen/HFpEF leiden, dus cardiomyocyt dysfunctie, cardiale microvasculaire dysfunctie, ontsteking, insuline resistentie en bindweefselvorming. De 20 niet-coderende RNA moleculen die in diermodellen zullen worden onderzocht voor hun causale bijdrage aan HFpEF zullen in 1 of meerdere (maximaal 5) van onderstaande diermodellen worden bestudeerd. Literatuur ondersteunt het combineren van verschillende diermodellen om te komen tot zinvolle translationele bevindingen (Horgan 2014). De keuze van het diermodel wordt bepaald door de resultaten van de *in vitro* studies uit stap 2 van de beschreven strategie (3.4.1). Omdat NSAID's en opioïden interfereren met ontsteking, zal in geval dat ontsteking een primaire uitkomstmaat is, afgeweken worden van de GV SOLAS richtlijnen voor pijnbestrijding en geen analgesie toegepast worden. In dat geval worden de humane eindpunten nog scherper omlijnd.

Tabel 1.





* hoog vet dieet veroorzaakt pre-diabetes.

**Hoewel TAC een acuut model van drukoverbelasting is, in tegenstelling tot een meer progressief verloop in mensen, reproduceert het model meerdere pathofysiologische processen die ook in de mens plaatsvinden, inclusief hypertrofie en diastolische dysfunctie (Monnet et al. Ann Thorac Surg 2005; Horgan et al. Journal of Cardiac Failure 2014; Respress et al. Circ Res 2012).

***Phenylephrine wordt gebruikt als model voor acute drukoverbelasting, voor het aanschakelen van immediate early genes en signaleringspaden in cardiomyocyten (Bueno et al. Circ Res 2001;88:88-96).

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.

Algemene doelstelling

De algemene doelstelling van het project is nieuwe therapeutische targets te vinden voor de behandeling van HFpEF. Als strategie is gekozen allereerst kandidaatgenen die uit bestaande datasets komen te manipuleren in relevante celmodellen *in vitro*. Op basis van de rol die dan gevonden wordt voor een bepaald kandidaatgen, wordt een keuze gemaakt voor het *in vivo* muizenmodel: AngII infusie of TAC, eventueel in combinatie met hoog vet dieet (als de kandidaat ook een rol heeft in metabolisme), of CVB3 infectie. Als uit een eerste *in vivo* experiment blijkt dat het kandidaatgen een rol heeft in pre-diabetes (AngII/TAC en hoog vet dieet), wordt een tweede *in vivo* experiment uitgevoerd met een ander muizenmodel van diabetes tensie dat een meer gevorderd stadium van diabetes onderzoekt: diabete $db^{-/-}$ muizen in combinatie met drukoverbelasting door AngII infusie of TAC.

Samenhang tussen onderdelen

De samenhang tussen de beschreven dierproeven wordt bepaald door de samenhang tussen de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan hartfalen. Deze 5 processen vinden altijd in combinatie met elkaar plaats tijdens de ontwikkeling van hartfalen. Echter, hun individuele bijdrage

verschilt afhankelijk van de betrokken risicofactoren. Bijvoorbeeld, bij enkel hypertensie als onderlegger zijn er relatief minder metabole veranderingen in het hart, en bij enkel diabetes of obesitas is er relatief minder cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming in het hart. In aanwezigheid van een virus of na een myocardinfarct zal de ontstekingsrespons het sterkst zijn. Het manipuleren van kandidaatgenen die op 1 of meer van de 5 processen aangrijpen, maakt het mogelijk de mate van causale betrokkenheid bij hartfalen van deze processen in kaart te brengen, en maakt het tegelijkertijd mogelijk om nieuwe therapeutische targets te identificeren. Om die reden zal voor elk kandidaatgen eerst de betrokkenheid bij de 5 processen in kaart worden gebracht middels *in vitro* experimenten die de 5 processen artificieel uit elkaar trekken, en vervolgens zal op basis van de resultaten een *in vivo* model gekozen worden dat de gevonden betrokken processen het best representeert (**Tabel 2**).

Tabel 2.

Keuzemomenten en go/no-go momenten:

- 1) Validatie van de expressie van kandidaatgenen in historische samples: van 60 naar 20 kandidaatgenen. Van deze 20 gekozen kandidaatgenen worden in deze stap het celtype/bron van expressie bepaald, zodat *in vitro* validatie experimenten in stap 2 gericht op relevante celtypen kunnen worden opgezet.
In deze eerste stap, die enkel gebruik maakt van historische samples, komen we dus tot 20 kandidaatgenen voor bestudering in nieuwe proefdierexperimenten.

- 2) validatie in *in vitro* modellen middels manipulatie van de individuele kandidaatgenen in hun celtype van oorsprong: wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in cellulaire readouts van een van de 5 pathofysiologische processen betrokken bij hartfalen? Hierbij wordt gebruik gemaakt van zowel cellen uit neonatale dieren, die met name celgroei reflecteren, als cellen uit adulte dieren, die celmetabolisme en productie van bvb bindweefsel reflecteren.

- *Go/no-go moment:* -

Ja > verfijning van hypothese en verder met stap 3.

- Kandidaatgenen die een rol hebben in cardiomyocyt en/of microvasculaire dysfunctie zullen in stap 3 worden onderzocht in een muismodel van drukoverbelasting, cardiomyocyt en microvasculaire dysfunctie door TAC, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet.
- Kandidaatgenen die een rol hebben in fibrose en/of ontsteking zullen in stap 3 worden onderzocht in muismodellen van drukoverbelasting, fibrose en ontsteking door AngII, al dan niet in combi met hoog vet dieet.

Nee > stop.

- 3) validatie in *in vivo* model: heeft het kandidaatgen een rol in hartfalen? Hiertoe zal het

kandidaatgen in een diermodel van hartfalen worden gemanipuleerd, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet. Keuze van diermodel(len) wordt bepaald door de verfijnde hypothese uit stap 2. Wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF?

- *Go/no-go moment*: -

Ja > verfijning van de hypothese en nieuw dierexperiment met andere oorzaak leidend tot hartfalen. De verwachting is dat de meeste kandidaatgenen (16 van de 20) een rol blijken te hebben in hartfalen; uit onze ervaring blijkt dat de *in vitro* validatie stap een optimale keuze van kandidaatgenen mogelijk maakt.

Nee > stop.

- 4) Tweede validatiestap in *in vivo* model(len): heeft het kandidaatgen een rol in een ander model van hartfalen, en welke? In deze stap zullen we de rol van het kandidaatgen in een ander model van hartfalen bepalen, alsook inzoomen op het celtype waarin het kandidaatgen een rol speelt, en de vroege kandidaatgen-afhankelijke processen die betrokken zijn tijdens de ontwikkeling van hartfalen.
- 5) Valorisatie: plannen van vervolgstappen om kandidaatgen richting therapeutische toepassing te sturen. Hieronder vallen patentering, samenwerking opstarten met farmaceutische industrie voor financiering van experimenten in grotere proefdieren, publicatie, en uiteindelijk klinische trials.

Voorbeeld 1: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in hypertrofe harten en in historische cardiomyocytmonsters. In stap 2) zullen daarom neonatale rat cardiomyocyten gebruikt worden voor het bestuderen van celgroei responsen na manipulatie van het molecuul, en adulte rat cardiomyocyten voor het bepalen van metabole effecten na manipulatie van het kandidaatgen. Er zal gebruik worden gemaakt van adulte ratten die op een controle dieet hebben gestaan, of die zijn blootgesteld aan een hoog vet dieet.

Uit stap 2) komt dat het molecuul een rol heeft in cardiomyocyt metabolisme. Daarom zal in stap 3) het molecuul worden gemanipuleerd in een pre-diabetes model van muizen met hoogvetdieet en drukoverbelasting door TAC. Aan het einde van het experiment zal de hartfunctie van het dier in kaart worden gebracht (een van de twee primaire uitkomstparameters, naast cardiomyocyt dysfunctie), waarna het geexplanteerde hart onderworpen wordt aan uitgebreide moleculaire, cellulaire en histologische analyses die voor muis zijn opgezet en een beeld zullen geven van de moleculaire processen waarin het kandidaatmolecuul een rol heeft.

Als er een rol gevonden wordt voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het kandidaatgen vervolgens in stap 4) op maximaal 4 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetesotensie, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van TAC met hoogvetdieet voor het isoleren van cellen uit het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met TAC en hoogvetdieet voor het bepalen van celresponsen (vroege cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; en d) acute PE injectie voor het bepalen van de "immediate early" responsen in het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken).

Voorbeeld 2: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in virale myocarditis en in historische beenmergmicrofaag monsters. In stap 2) zullen daarom beenmergcellen gebruikt worden voor het bestuderen van inflammatoire responsen na manipulatie van het kandidaatgen.

Uit stap 2) komt dat het kandidaatgen een rol heeft in macrofagen. Uit onze ervaring blijkt dat dit soort genen vaak zowel in virale myocarditis als in ontstekingsprocessen bij drukoverbelasting een rol speelt (bvb macrofaag [REDACTED] heeft een rol in zowel drukoverbelasting (Corsten et al. Circ 2013) als in virale myocarditis (Heymans et al. Circ Res 2012)). Daarom zal in stap 3) het gen worden gemanipuleerd in een model van drukoverbelasting door Angiotensine II met als primaire uitkomstparameter hartfunctie. Als er een rol wordt gevonden voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het vervolgens in stap 4) op maximaal 5 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetesotensie, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van het eerdere AngII experiment voor het

isoleren van cellen uit het hart (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met AngII voor het bepalen van celresponsen (vroeg cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; d) virale myocarditis door CVB3 infectie met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder pathogene en metabole condities (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken); en e) myocardinfarct met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder steriele pro-inflammatoire en metabole condities (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken).

Keuzemomenten schematisch (besluitmodel):



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten
2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen
3	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen
4	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db ^{-/-} muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1-R2	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) ratten, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten extern worden besteld. Voor de moederdieren zal na het werpen een ander doel worden gezocht. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van wild type ratten, eventueel in combinatie met hoog vet dieet. Deze zullen direct voor de isolatie op humane wijze worden opgeofferd. ~~Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd.~~ Omdat estrogene de uitkomstparameter, celmetabolisme, beïnvloeden, worden alleen mannelijke dieren geïncubeerd. De keuze voor volwassen dieren wordt gemaakt op het moment dat een kandidaat molecuul een rol heeft in het metabolisme van de cardiomyocyt, omdat 1) deze uitleesparameter in cellijnen en in neonatale cellen niet of beperkt te meten is, en 2) een volwassen dier langere tijd blootgesteld kan worden aan metabole parameters in de circulatie, zoals een hoog vet dieet. Een hoog vet dieet induceert een pre-diabetische status in ratten en dit maakt het mogelijk om de chronische effecten van verhoogd circulerend insuline, glucose en vetzuren op cardiomyocyt metabolisme te bestuderen.

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

De neonatale dieren worden direct voor de isolatie opgeofferd. Voor de moederdieren zal na het werpen een

ander doel worden gezocht. De dieren ondergaan geen behandelingen.

Volwassen rat cardiale myocyten

Volwassen ratten ondergaan ofwel geen behandeling, of ze krijgen een hoog vet dieet gedurende maximaal 24 weken, of een gematcht synthetisch controle dieet, een "normaal vet dieet". De dieren worden direct voor de celisolatie op humane wijze opgeofferd.

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

In ons lab en binnen het onderzoeksinstituut CARIM hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van primaire harspieren en met het gebruik van deze cellen voor experimenten (zie bijvoorbeeld Corsten et al. Eur Heart J 2015; Heymans et al. Circulation 2013; van Almen et al. Ageing Cell 2012, Corsten et al. Circ Res 2012). Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groepsgrootten; onze ervaring is dat 4 biologische replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) rattenpups. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten worden besteld.

Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 1.5 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **1920 dieren**. Voor de moederdieren gaan we uit van gemiddeld 10 pups per drachtige moeder. In totaal gaat het dan om **192** moederdieren.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van volwassen ratten. Uit eerdere ervaringen met volwassen rat cardiomyocyten, in samenwerking met een andere onderzoeksgroep, is gebleken dat voor onze experimenten per rat voldoende cellen geïsoleerd worden voor 1 biologische replicaat met 4 experimentele condities, bijvoorbeeld controle sham, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie sham en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd. Vier biologische replicaten per groep van alle condities geven optimale statistiek en er zijn 3 experimentele readouts (genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie). Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom $3 \times 4 = 12$ ratten nodig.

-*Gezonde ratten*: Voor de validering van 50 van de 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen in gezonde ratten hebben we daarom nodig $50 \times 12 =$ maximaal **600 ratten**. De leeftijd van de volwassen ratten op het moment van isolatie is niet van invloed op de kwaliteit van de cardiomyocyten in gezonde condities van de rat.

-*Ratten op speciaal dieet*: Cardiomyocyten die geïsoleerd worden uit pre-diabetische ratten op hoog vet dieet en "normaal vet dieet"-gevoerde controle ratten, naar schatting voor de validering van 10 kandidaat niet-coderend RNA moleculen, zullen bij aanvang (start dieet) 2-4 maanden oud zijn. Hiervoor zijn 10 kandidaatgenen $\times 12$ ratten per gen $\times 2$ groepen = **240 ratten** benodigd, waarvan **120 ratten** een hoog vet dieet krijgen.

Estrogenen hebben een aanzienlijk effect op regulatie van glucose opname, GLUT4 translocatie, vetzuuropname en CD36 translocatie in het hart (Murphy E, Heart Fail Rev. 12: 293-300, 2007; Tepavcevic S, Horm Metab Res. 43: 524-30, 2011). Vanwege deze effecten van estrogenen kunnen de gegevens van beide sexen niet worden gecombineerd. Derhalve zou een gebruik van beide sexen een verdubbeling van de aantallen betekenen. Wij hebben gekozen om alleen experimenten te doen met mannelijke ratten om daarmee de effecten van estrogenen uit te sluiten.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire cardiale cellen. Echter, de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun differentiatiepotentieel, metabolisme en groei (zie bijvoorbeeld Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes)– processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen – maakt ze ongeschikt voor het bestuderen van de processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen secundair aan het metabole syndroom, namelijk metabolisme, celgroei en –differentiatie.

-Het gebruik van organoiden zal in de toekomst overwogen worden, maar momenteel zijn er nog geen organoiden van het hart ten behoeve van het bestuderen van hartfalenprocessen beschikbaar.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen, omdat hiermee slechts naar expressiepatronen gekeken kan worden, en in de samples geen interventie meer mogelijk zijn. De historische samples zullen de benodigde (cel)experimenten wel verminderen, omdat ze het selecteren van kansrijke kandidaatgenen ondersteunen.

Vermindering:

-Tijdens 1 isolatie van neonatale ratten worden zowel cardiale myocyten als fibroblasten gekweekt. Beide celtypen zullen gebruikt worden voor experimenten. De celcultuur is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Wanneer van te voren duidelijk is dat een geplande isolatie niet nodig is, zal deze tijdig geannuleerd worden.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties vermindert.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloed; de dieren ondergaan geen behandelingen of enkel een hoog vet dieet, dus geen invasieve behandelingen. Enkel wanneer er een indicatie is dat de beoogde kandidaat niet-coderend RNA moleculen een rol spelen in metabolisme, zal hun rol bestudeerd worden in cardiomyocyten van pre-diabetische ratten geïnduceerd door een hoog vet dieet. De cellen die uit de volwassen harten geïsoleerd worden zijn uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep, en er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd.

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

De dieren gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun hart voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Moederdieren kunnen lichte stress ervaren

Volwassen rat cardiale myocyten

-Gezonde ratten: geen aantasting van welzijn verwacht.

-Ratten op speciaal dieet: De ratten die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen mogelijk huidproblemen, pre-diabetische symptomen zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie/polydipsie en verminderde fysieke gezondheid. Het "normaal vet dieet" is gelijkaardig aan een regulier dieet, echter is net als het hoog vet dieet synthetisch met bekende samenstelling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Verstoring van nest

Volwassen rat cardiale myocyten

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetische staat in de rat.

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

Bij het bereiken van humane eindpunten zullen de dieren voortijdig worden opgeofferd.

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.

Bij gebrek aan ondernemingsgedrag, ernstige huidproblemen, immobiliteit en apathie zal een dier voortijdig worden opgeofferd.

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

0-5% van de dieren op een hoog vet dieet.

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.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Neonatale ratten: licht

Moeder ratten: licht

Volwassen rat cardiale myocyten

Gezonde ratten: licht

Normaal vet dieet-gevoede ratten: licht

Hoog vet dieet-gevoede ratten: licht

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.

De neonatale en volwassen dieren worden gedood omdat hun hart volledig nodig is voor de isolatie van de cardiale cellen.

De moederdieren worden wanneer mogelijk in leven gehouden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.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 |
|------------|--|
| 2-R2 | Isolatie van beenmergcellen uit muizen |

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 zal gebruik worden gemaakt van volwassen, wild type en transgene muizen, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd. De primaire uitkomstparameter is beenmerg isolatie tbv de isolatie van immuuncellen.

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.

Zowel de tibia's als de femurs zullen operatief verwijderd worden na euthanasie van de muis. Opeenvolgend worden na de uiteindes van de femurs en de tibias verwijderd zodat het beenmerg met een natuurlijke zoutoplossing uit de botjes kan worden gespoeld.

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

In ons lab hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van beenmergcellen uit muizen voor experimenten (zie bijvoorbeeld Corsten et al. Eur Heart J 2015; Corsten et al. Circ Res 2012). Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groeps grootten; onze ervaring is dat 4 replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van mannelijke en vrouwelijke muizen. Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per

experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 10 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **288 dieren**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire beenmerg cellen. Echter, deze aanpak geeft de mogelijkheid om de polarisatie (richting pro- of anti-inflammatoire macrofaag) en differentiatie van de geïsoleerde beenmergcellen te reguleren en te bestuderen, en de rol van kandidaat moleculen hierin. Daarnaast is het gebruik van cellijnen niet gewenst aangezien reeds gedifferentieerde cellen andere eigenschappen bezitten, verder verwijderd van de gewenste kenmerken (Passmore et al., Immunology 2001).

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen maar wel verminderen.

Vermindering:

-De celtoegankelijkheid is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Tevens worden zowel de tibia als de femur gebruikt om het aantal geïsoleerde cellen zo hoog mogelijk te maken.

-Indien mogelijk worden beenmergcellen geogst uit muizen die voor een ander experimenteel doel werden geëuthanaseerd.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties verminderd.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloedt; de dieren ondergaan geen behandelingen. De dieren worden gedood alvorens cellen worden geïsoleerd. De cellen afkomstig van beenmerg isolatie worden uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep.

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

De dieren gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun beenmerg voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

nvt

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

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.

De muizen worden gedood omdat hun beenmerg volledig nodig is voor de isolatie van de immuuncellen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	3-R1	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Arteriële hypertensie, aortaklepverkalking, myocardinfarct en virale infectie zijn belangrijke risicofactoren voor het ontwikkelen van hartfalen. Vaak hebben patiënten ook andere aandoeningen die onder het metabole syndroom vallen, zoals overgewicht en diabetes.

- Angiotensine II (AngII) is een peptide dat vrijkomt onder hypertensieve omstandigheden en zowel in de circulatie als perifeer werkt op de vaten (constrictie) en op de cellen (het promoot celgroei, ontsteking, bindweefselvorming). Om deze reden wordt in ons onderzoek vaak gekozen om chronische arteriële hypertensie na te bootsen en hartfalen te veroorzaken in muizen middels subcutane chronische angiotensine II infusie gedurende maximaal 12 weken. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van AngII en daarom volstaat een meting middels tail cuff.
- Phenylephrine is een sympathomimetisch medicijn dat de acties van epinephrine nabootst en arteriële hypertensie veroorzaakt, en wordt in experimentele modellen gegeven om acute hypertensie te veroorzaken en de onmiddellijke respons van het hart hierop te onderzoeken.
- Transverse aortic constriction (TAC) is de meest gebruikte en bestudeerde methode om aortaklepverkalking, leidend tot acuut hartfalen, na te bootsen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de drukgradient in de aortaboog gekwantificeerd kan worden, wat het mogelijk maakt om linker ventrikel hypertrofie te stratificeren. De acute hypertensie geïnduceerd door TAC veroorzaakt een 50% toename in linker ventrikel massa binnen twee weken, daarom is dit model een goede keuze voor het bestuderen van farmacologische and moleculaire interventies die hypertrofie kunnen remmen.
- Myocardinfarct (MI) in de muis is een veelgebruikt model om myocardremodellering in de mens, na

een infarct of bij vaatlijden, na te bootsen. Het afsterven van een deel van het hartweefsel veroorzaakt ontsteking en in tweede fase remodelering van het gezonde hartweefsel, inclusief cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming.

- Een acute virale infectie leidt tot verhoogde hartcelafbraak en ontsteking, en vormt daardoor een levensbedreigende situatie. Coxsackievirus B3 (CVB3)-infectie geïnduceerde myocarditis is het meest gebruikte en best bestudeerde model van acute myocarditis-geïnduceerd hartfalen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de ziekte progressie, cardiale ontsteking gevolgd door afbraak van hartspiercellen en fibrose vorming, nauw verwant is aan het klinische beeld.

AngII-behandeling, TAC, MI of CVB3 wordt gecombineerd met een hoogvetdieet in het geval het kandidaat niet-coderend RNA molecuul een rol blijkt te hebben in metabolisme.

De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis kan op twee manieren gebeuren:

- 1) injectie van een korte DNA sequentie al dan niet in een vector (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde virale vector)
- 2) transgene muis

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.

Het dier zal een aantal behandelingen ondergaan:





Een dier is maximaal 12 (max tijd tussen neonatale injectie en start behandeling) + 24 (max duur behandeling) = 36 weken in experiment. Dieren zijn nooit ouder dan 1 jaar bij opoffering.

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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groepsgrootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke wildtype of genetisch gemodificeerde muizen. Indien de genetisch gemodificeerde muizen reeds gefenotypeerd zijn door andere onderzoekers, zal gebruik worden gemaakt van muizen die onder normale niet-pathologische omstandigheden geen ongerief ondervinden van de genetische modificatie. Indien de genetisch gemodificeerde muizen nog gemaakt moeten worden, zal dit uitbesteed worden en zal het ongerief geregistreerd worden alvorens de dieren tbv dit onderzoek binnengehaald worden. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul zal gebruik worden gemaakt van maximaal 160 muizen. Er zijn maximaal 4 experimentele groepen (A1-A4) nodig. Per experimentele groep schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 40 muizen te gebruiken (20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie).

In 5 jaar tijd zullen maximaal 20 kandidaat moleculen onderzocht worden volgens het besluitmodel uit het projectvoorstel.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in cardiomyocyt dysfunctie en/of endotheeldysfunctie, zal gekozen worden voor TAC als experimenteel model van chronisch hartfalen.
 - o Vervolgens worden maximaal 16 kandidaatgenen ook onderzocht in een acuut model van arteriele hypertensie middels PE injectie, waarbij de primaire uitkomstparameter enkel cardiomyocyt hypertrofie is. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het TAC experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire

uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na TAC (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in ontsteking en/of bindweefselvorming, zal gekozen worden voor AngII als experimenteel model van hartfalen. Hierbij zullen per kandidaatgen maximaal 2 experimenten plaatsvinden voor het bepalen van de primaire uitkomstparameters; cellulaire responsen worden best gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week) en hartfalen wordt best gemeten laat na AngII (max 12 weken).
 - o Vervolgens wordt de rol van maximaal 16 kandidaatgenen ook bestudeerd in maximaal twee andere modellen van hartfalen waarbij ontsteking een rol speelt, namelijk MI- en/of CVB3-geïnduceerd hartfalen. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het AngII experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.
- Als genen ook een rol in metabolisme hebben, wordt gekozen voor een combinatie van AngII, TAC, MI of CVB3 met hoog vet dieet.

Voor elk experiment zijn per kandidaat molecuul maximaal 160 muizen nodig. De volgende tabel geeft een samenvatting van de aantallen per experimenttype:

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, of genetisch gemodificeerde muizen, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren (AAV) voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen (intracardiale injecties) of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik gemaakt wordt van neonatale muizen voor de injectie van het AAV, wordt pas met AngII/hoog vet dieet/TAC operatie/MI operatie/PE begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud). CVB3 wordt geïnjecteerd in muizen van minimaal 4 weken oud.

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: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoiden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoiden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, de experimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groeps grootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige AngII model is een redelijk verfijnd model om hartfalen te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken (Heymans S, Circulation 2013). Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken (Heymans et al, Circulation 2013). Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC en MI operaties uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. Het model van CVB3 infectie is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om virale myocarditis te onderzoeken en door gebruik te maken van CVB3-geïnjecteerde muizen kunnen we de virale en ontstekingsrespons in het hart en de daaropvolgende ontwikkeling van hartfalen bestuderen (Fairweather and Rose PMC 2008). Het PE model is een geaccepteerd model van acute arteriële hypertensie met directe effecten op cardiomyocyten (Bueno et al. Circulation Research. 2001;88:88-96). De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC/MI operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. De dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen, en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

In geval de dieren een operatie ondergaan (minipompimplantatie, TAC of MI) krijgen de dieren peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS.

Alle dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren. In het geval van het gebruik van virale vectoren is het ongerief door kandidaat molecuul manipulatie vooraf niet in te schatten. In het geval van het gebruik van transgene dieren is het ongerief voorafgaand aan de proef geregistreerd.

-Angiotensine II / TAC /MI/CVB3/PE worden toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC en MI operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-een PE injectie veroorzaakt een acute steiging in bloeddruk en kan gepaard gaan met hoofdpijn en duizeligheid.

-Hoogvetdieet: het vet in de voeding kan de vacht vettig maken. Het zelfverzorgend gedrag van de dieren zal dus nauwlettend in het oog worden gehouden. De muizen die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen pre-diabetes symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte en verminderde fysieke gezondheid.

-CVB3 veroorzaakt in bepaalde muizenstammen gastro-intestinale klachten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) en MI induceren beide een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

PE veroorzaakt acute hypertensie met bovenbenoemde symptomen.

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetes staat in de muizen.

Virale myocarditis gaat gepaard met een sterke ontstekingsreactie in het hart die hartfalen veroorzaakt.

Daarnaast is CVB3 is een enterovirus met gastrointestinale effecten.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC/MI operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en 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.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC/MI / CVB3 infectie al dan niet in combi met hoog vet dieet, gepaard met moeilijk ademen en apathie. De mate van ongerief wordt ingeschat op basis van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.
- Koorts en dehydratie ten gevolge van CVB3 infectie.
- Neonatale pups: geen melkspot/ verstoten uit nest.
- Ernstige huidproblemen als gevolg van hoog vet dieet.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren.

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>4-R1</td><td>Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db^{-/-} muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	4-R1	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db ^{-/-} muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen
Volgnummer	Type dierproef				
4-R1	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db ^{-/-} muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen				

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Kandidaat niet-coderende RNA moleculen die een rol blijken te hebben in het ontwikkelen van hartfalen in een pre-diabetes model (angII/TAC + hoog vet dieet), zullen nader onderzocht worden in een meer vergevorderd diabetes model. Hiervoor maken we gebruik van transgene db^{-/-} muizen. Deze muizen zijn een geaccepteerd en goed bestudeerd model voor obesitas en type 2 diabetes. De muizen presenteren zich met diabetische symptomen die een leeftijdsgebonden progressie volgen, wat ook wordt gezien in patiënten met het diabetes. Daarnaast wordt in deze muizen ook een vroege insuline resistentie gedetecteerd dat resulteert in hyperglycemia. Db^{-/-} muizen worden gebruikt voor het bestuderen van cardiale gevolgen van diabetes, zoals diabetische cardiomyopathie.

Om de rol van de kandidaat moleculen te bestuderen in het metabole syndroom (diabetes, obesitas en hypertensie), worden de db^{-/-} muizen blootgesteld aan drukoverbelasting door AngII infusie of TAC operatie. Dit zal een meer klinisch relevant beeld geven van de patiënten die zich presenteren met het metabole syndroom in de kliniek.

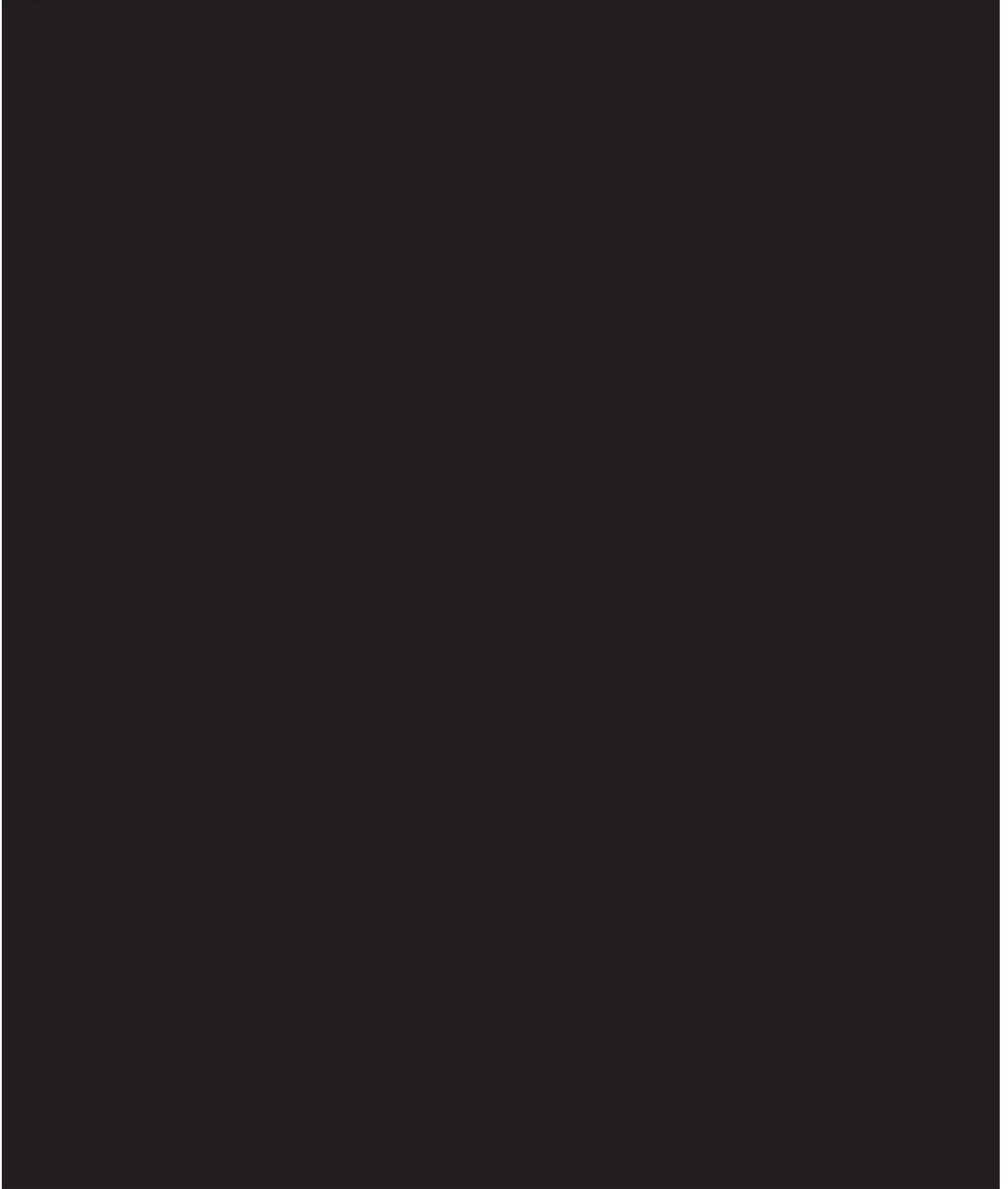
De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van Angiotensine II en daarom volstaat een meting middels tail cuff.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis zal gebeuren door de injectie van een korte DNA sequentie (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde

virale vector).

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.

Het dier zal een aantal behandelingen ondergaan:



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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groeps grootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen (mannelijk en vrouwelijke) met een Db-/- achtergrond en controle db^{+/+} muizen. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 160 muizen te gebruiken (40 per experimentele groep; 20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie). Het aantal experimentele groepen per experiment is 4:

In 5 jaar tijd zullen maximaal 16 kandidaat moleculen onderzocht worden met deze methode. In totaal wordt er dus geschat zo'n **2560 muizen** nodig te hebben.

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen van WT drachtige moeders of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruikt wordt van neonatale muizen voor de injectie van het virus, wordt pas met angiotensine II begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud).

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: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoïden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoïden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, *in vivo* experimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groepsgrootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige model is een redelijk verfijnd model om het metabole syndroom te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken (Bilsen et al, PLoS One 2014) en de muizen spontaan obesitas en diabetes ontwikkelen. Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken (Heymans et al, Circulation 2013). Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC operatie uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. Alle dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren krijgen peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS. De dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardiale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren door de genmanipulatie. Dit is vooraf niet in te schatten.

-AngII/TAC wordt toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken of slecht helen tgv diabetes. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-db^{-/-}: Deze dieren ontwikkelen diabetische symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie, polydipsie, slechte wondheling en verminderde fysieke gezondheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) induceert een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

Db^{-/-} knockout induceert obesitas en diabetes.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten. Diabete muizen krijgen aangepaste verzorging/ huisvesting passend bij het ziektemodel.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en 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.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC, gepaard met moeilijk ademen en apathie.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren. Db^{-/-} muizen ervaren ernstige immobiliteit als gevolg van ernstig overgewicht en diabetes. Mate van ongerief wordt o.a. bepaald aan de hand van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



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

AVD107002017924

Bijlagen

1

Datum 12 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" met aanvraagnummer AVD107002017924. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 maart en 11 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. De vragen van de CCD zijn beantwoord en de ongeriefclassificatie en totaal aantal dieren in de aanvraag zijn aangepast. De Niet-technische samenvatting is ook tekstueel aangepast.

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, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 april 2017 tot en met 1 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Er is sprake van ernstig ongerief.

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 maart 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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. 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:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 april 2017 tot en met 1 april 2022, voor het project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" met aanvraagnummer AVD107002017924, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Zie voorwaarden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 maart en 11 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten				1920 neonatale ratten en 1032 volwassen ratten.
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	2.952	100% Licht	
3.4.4.2 Isolatie van beenmergcellen uit muizen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	288	100% Licht	
3.4.4.3 Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	16.000	100% Matig	
3.4.4.4 Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db/-muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.560	25% Ernstig 75% Matig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

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

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

AVD107002017924

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:

AVD107002017924

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

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