

model. Dit model is bewezen bruikbaar voor *in vivo* fibroblast herprogrammering na retrovirale gen transfer<sup>4,12,13</sup>.

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

### **Subdoel 1. *In vitro* herprogrammering met weefsel uit diverse muizenlijnen.**

We starten met het *in vitro* testen van (combinaties van) 20 cardiale transcriptiefactoren en kleine moleculen op fibroblasten. De optimale combinatie zal worden bepaald met de substractie methode van Ieda et al<sup>4</sup>. Met deze methode worden systematisch factoren weggelaten uit de transcriptiefactor mix, om de individuele bijdrage van elke factor in de combinaties te kunnen bepalen. 10.1 c en 10.2 g

Het type fibroblasten is bepalend voor de efficiëntie en uitkomst van de herprogrammering naar cellen van het pacemaker- en geleidingssysteem<sup>17</sup>. Daarom willen we deze tests uitvoeren in drie verschillende muizen fibroblasten, in deze volgorde:

1. Muizen embryonale fibroblasten ("MEF's") geïsoleerd uit muizen embryo's van 14 dagen zwangere muizen<sup>16</sup>. Herprogrammering van MEF's heeft in het algemeen de hoogste efficiëntie (~10%), en MEF's kunnen *in vitro* ongeveer 50 keer worden vermeerderd vóór gebruik, waardoor minder dieren nodig zijn voor de screening.
2. Cardiofibroblasten ("CF's") geïsoleerd uit neonatale muizen<sup>3</sup>. Deze fibroblasten moeten meteen na isolatie gebruikt worden voor herprogrammering, en hebben een lagere herprogrammering efficiëntie (~8%), maar bieden het voordeel dat ze al meer lijken op hartcellen.
3. Fibroblasten geïsoleerd uit de staart van muizen van 8-12 weken oud. Deze fibroblasten hebben een relatief lage herprogrammering efficiëntie (slechts ~6%). Echter, bevestiging van herprogrammering activiteit in deze cellen wordt in het onderzoeksveld vaak uitgevoerd, en door referenten meestal vereist, om uit te kunnen sluiten dat kleine hoeveelheden primitieve spier- of hartcellen die in MEF's en CF's aanwezig kunnen zijn als contaminatie<sup>17</sup>, voor de waargenomen effecten verantwoordelijk zijn. We voeren deze controle alleen uit voor (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen die zowel in MEF's als in CF's aan de criteria voldoen.

De herprogrammering wordt bepaald met immunofluorescentie (onder andere FACS—flow cytometrie), immunohistochemie en/of qPCR analyses van markers voor het pacemaker en geleidingssysteem (zoals 10.1 c en 10.2 g

Deze getrapte aanpak stelt ons in staat om ons begrip van deze technologie en de kans op het vinden van effectieve herprogrammeringscombinaties maximaal te vergroten, en deze screening toch uit te voeren met een minimum aan proefdieren.

### **Subdoel 2. *In vivo* herprogrammering: validatie in myocardinfarct muizen**

Veelbelovende (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen, die tenminste 6% efficiëntie vertonen voor herprogrammering, in 1 van de fibroblast types beschreven in subdoel 1, worden *in vivo* getest in het muizen LAD myocardinfarct model, een bewezen setting voor het testen van *in vivo* fibroblast transductie met retrovirale gen transfer<sup>4,12,13</sup>.

In dit model wordt een myocardinfarct in de voorwand van het hart geïnduceerd door afbinden van de LAD tijdens een thorax operatie, en worden virussen die cardiale transcriptiefactoren



tot expressie kunnen brengen in het hart geïnjecteerd. 10.1 c en 10.2 g

Voorafgaand aan de doding wordt onder anesthesie de kleurstof "Evans Blue" via de holle ader ingespoten om de grootte van het infarct te bepalen. Hierna zullen we onder andere Langendorff perfusie experimenten uitvoeren op het geïsoleerde hart om de elektrofysiologische eigenschappen van het weefsel in de buurt van het infarct te bepalen. Ook zullen we vervolgens worden individuele hartcellen isoleren geïsoleerd en gebruikt voor "patch-clamp" experimenten en weefsel isoleren voor karakterisatie middels qPCR. Er zal geprobeerd worden om zowel de Langendorff als de "patch-clamp" experimenten OF zowel de Langendorff als de qPCR op hetzelfde hart uit te voeren. Mocht dit ten koste gaan van de kwaliteit van het vervolg experiment, dan zullen er voor de verschillende experimenten aparte harten gebruikt worden. Met deze experimenten kunnen we de eigenschappen van de

10.1 c en 10.2 g

n met de relevante endogene cellen, en de efficiency efficiëntie van herprogrammering beoordelen. We verwachten op grond van de literatuur, dat we 20% herprogrammering kunnen bereiken<sup>4</sup>. De hogere herprogrammering efficiëntie *in vivo* verloopt waarschijnlijk zoveel efficiënter dan in vergelijking tot *in vitro* komt waarschijnlijk doordat de fibroblasten de juiste 3D weefselstructuur (onder andere de extracellulaire matrix) hebben, en daarnaast profiteren van de door omliggende cellen uitgescheiden eiwitten en andere factoren<sup>4</sup>.

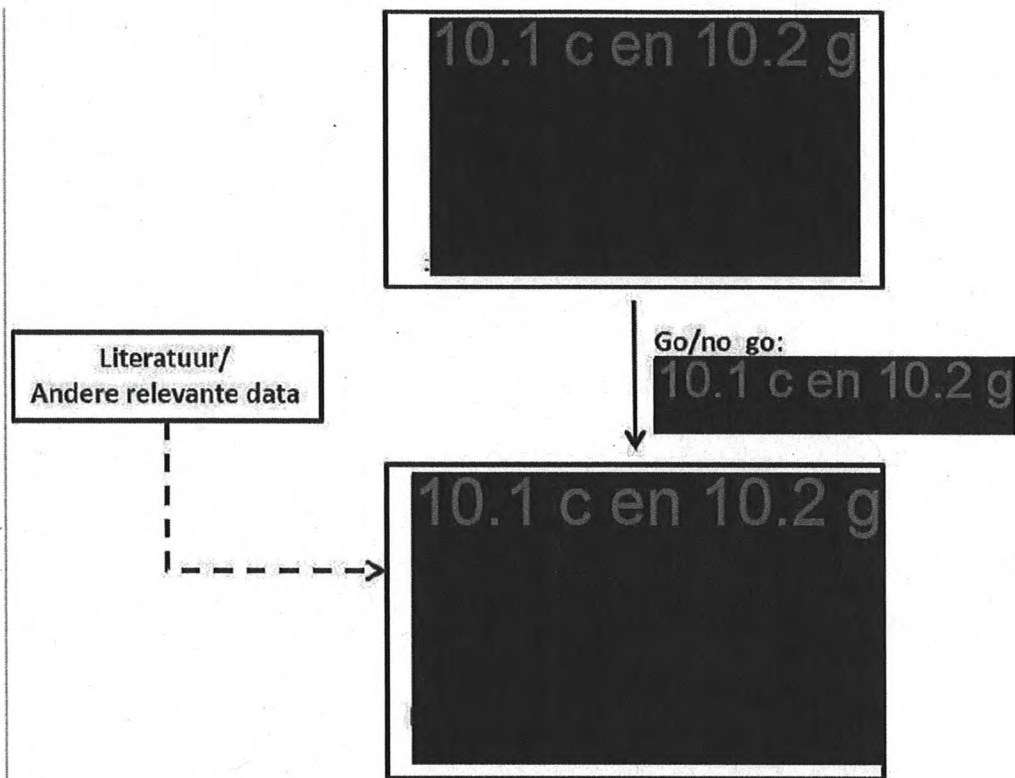
3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het testen van de verschillende (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen gebeurt in muizen waarbij de expressie en effectiviteit wordt vastgesteld. Wanneer een combinatie van goede expressie en *in vitro* herprogrammering in 10.1 c en 10.2 g

, en voeren we functionele studies uit.

In deze studie maken we gebruik van een getrapte aanpak (zie Figuur 1):

1. De herprogrammering efficiency efficiëntie van de combinaties eerst bepaald met een serie *in vitro* experimenten (Subdoel 1). Hierbij hanteren wij een minimale herprogrammeringsefficiëntie van 6%.
2. Succesvolle combinaties worden vervolgens *in vivo* gevalideerd in het muizen LAD myocardinfarct model (Subdoel 2).
3. Gepubliceerde combinaties met een hoge herprogrammering efficiëntie *in vivo* valideren in het muizen LAD myocardinfarct model (Subdoel 2).



**Figuur 1.** Weergave van de verschillende subdoelen (behorende bij de bijlagen 1 en 2), met de procedure voor het testen van verschillende (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen. De zwarte pijlen geven het standaard pad weer waarbij de combinaties eerst in vitro worden geselecteerd, om vervolgens te worden gevalideerd in een in vivo model. Daarnaast willen wij nieuwe combinaties die tijdens dit project worden gepubliceerd en een grotere herprogrammering efficiëntie geven dan wij op dat moment hebben behaald, direct in vivo testen (gestippelde pijl).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	In vitro herprogrammering met weefsel uit diverse muizenlijnen
2	In vivo herprogrammering: validatie in myocardinfarct muizen
3	
4	
5	
6	
7	
8	



9	
10	



## Format DEC-advies

---

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

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

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD <sup>10.2 .e. en g</sup> 20171885-13
2. Titel van het project Reparatie van het pacemaker en geleidingssysteem middels herprogrammering
3. Titel van de NTS Reparatie van het pacemaker- en geleidingssysteem door genetische herprogrammering
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer AVD <sup>10.2 .e. en g</sup> 20171885-3 (aanpassingen van de eerste wijziging zijn in rood weergegeven) De aanpassingen ten opzichte van de tweede wijziging zijn in **groen** weergegeven.
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC <sup>10.2 .e. en g</sup>
  - telefoonnummer contactpersoon <sup>10.2 .e. en g</sup>
  - e-mailadres contactpersoon <sup>10.2 .e. en g</sup>
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC 28 september 2018/ 21 juni 2019/15 oktober 2019
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken 4 oktober 2018/27 juni 2019/17 oktober 2019
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot 4 oktober tot en met 5 oktober 2018/ 28 juni t/m 9 juli 2019
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD 16 oktober 2018/17 juli 2019/28 oktober 2019
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

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

*De IvD heeft uitgebreid gesproken met de aanvragers over het verrichten van een pilot in een andere stam. Bij nadere analyse van de literatuur en de gegevens over uitval in 96 MI operaties in de FVB achtergrond binnen het eigen onderzoeksinstituut, blijkt er niet veel verschil te zijn tussen de uitval in andere stammen ten opzichte van de FVB stam.*



*De IvD vindt het verrichten van de pilot in een andere stam daarom niet meer opportuun. De vorige wijziging is daarom opnieuw ingediend bij de CCD. In de coverletter van de aanvrager is deze conclusie van de IvD verder onderbouwd en is de nieuwe analyse weergegeven.*

*Voor de volledigheid is de coverletter van de aanvragers met een toelichting van de IvD hieronder opgenomen in dit document omdat dit belangrijk is geweest voor de beoordeling van deze nieuwe wijziging en het maken van de ethische afweging door de DEC.*

**Cover letter:**

Geachte CCD,

Graag willen we vanuit de IvD- [REDACTED] de wijziging van het project AVD- [REDACTED] 20171885 met de titel "Reparatie van het pacemaker en geleidingssysteem middels herprogrammering" toelichten. Voor dit project is eerder een wijzigingsverzoek gedaan (AVD- [REDACTED] 20171885-1). De CCD besloot het DEC advies deels te volgen door alleen een vergunning te verlenen voor het verrichten van een pilot experiment. Over de verhoging van het aantal dieren zou pas na deze pilot een ethische afweging gemaakt kunnen worden. In deze pilot zou het myocardinfarct (MI) model in een andere muisstam onderzocht worden. Aanleiding hiervoor was een publicatie (zie [REDACTED] 10.2.e. en g [REDACTED]) waarin het MI model in 5 verschillende muisstammen is vergeleken. Uitval door infarct ruptuur en acute hartfalen in BALB/c was veel lager dan in FVB. De FVB achtergrond was in deze vergunning gekozen omdat alle benodigde transgene muizen deze achtergrond hebben. Bij nadere bestudering van het desbetreffende artikel gevolgd door een herberekening blijkt een verkeerde conclusie getrokken te zijn. Er is vrijwel geen verschil tussen BALB/C en FVB in het aantal 'geslaagde MI operaties'. Dit komt voor een deel doordat muizen die een te kleine of geen infarct hebben na MI ge-excludeerd zijn in de studie terwijl dergelijke muizen onderdeel zijn van "onze" uitvalsdefinitie. Bovendien komt het percentage 'geslaagde MI operatie' in FVB uit de studie vrijwel overeen met het percentage 'geslaagde MI operaties' uit eigen onderzoek met FVB muizen. Vanuit de IvD vinden we het niet meer verantwoord om deze pilot te laten verrichten omdat we verwachten dat er geen verschil gevonden zal worden tussen deze twee achtergronden wanneer alle vormen van uitval geïnccludeerd worden. Aangezien deze analyse veel tijd gekost heeft en we mede daardoor geen bezwaar meer kunnen maken tegen het genomen besluit, dienen we hetzelfde wijzigingsverzoek nogmaals in ter beoordeling, maar ditmaal zonder de pilot studie.

Met vriendelijke groet,  
IvD- [REDACTED]

Bijlage: Argumentatie verkeerde interpretatie van de literatuur over het MI model in FVB.



### **Bijlage: Argumentatie verkeerde interpretatie van de literatuur over het Myocardinfarct (MI) model in de FVB achtergrond.**

In deze bijlage zullen we met verschillende argumenten toelichten hoe de data uit het desbetreffende artikel verkeerd geïnterpreteerd zijn. Daarnaast is op basis van 96 MI operaties in FVB muizen) die verricht zijn in onze onderzoeksinstelling, opnieuw een vergelijking gemaakt met het percentage geslaagde operaties met het desbetreffende artikel.

#### **1. Onjuiste vergelijking op basis van gegevens in artikel.**

In het artikel bleken de volgende componenten de getoonde percentages te vertekenen:

- a) Dieren met een te klein infarct waren ge-excludeerd uit de gepubliceerde studie, terwijl 42% van de uitval in het model van de aanvrager juist veroorzaakt werd door een te klein of geen hartinfarct;
- b) In de publicatie waren ook dieren die een sham-operatie ondergaan hadden, meegerekend tot de verrichte hartinfarct operaties, terwijl deze dieren geen risico lopen door uitval door een ruptuur. Voor een goede vergelijking hadden die niet meegerekend mogen worden;
- c) In de publicatie waren dieren die direct na het induceren van het hartinfarct gedood waren om de grootte van het infarct te meten, meegerekend met het totaal aantal operaties, terwijl die ook geen risico lopen om later uit te vallen ten gevolge van een ruptuur;
- d) In de publicatie was er geen HEP opgesteld voor een te laag lichaamsgewicht waardoor er dus ook geen uitval was door het bereiken van een te laag lichaamsgewicht.

#### **2. Uitval in transgene lijnen op FVB achtergrond deels vertekend doordat het transgen het risico op een ruptuur kan verhogen door een afwijking in de aanleg van het hart.**

- a) Voor het vergelijken van de uitval in de verschillende achtergronden, hadden alleen FVB operaties (binnen het instituut) gebruikt moeten worden waarbij het transgen geen invloed heeft op de uitkomst van een hartinfarct met een geschikte grootte, zoals in de publicatie gedaan is.
- b) Binnen de instelling zijn voldoende data in deze achtergrond met dit model. Er is een nieuwe analyse gedaan met deze experimenten (zie hieronder).

#### **3. Uitval door bereiken van te laag lichaamsgewicht.**

- a) Om uitval door een hartfalen te voorkomen, was de HEP op 15% gewichtsverlies gesteld. In een pilot zijn een aantal dieren gevolgd die 15% gewichtsverlies hadden binnen dit model. Deze dieren vielen niet meer dan 20% af en herstelden net zo snel als muizen die onder de 15% gewichtsverlies bleven. Uit analyse blijkt dat het gewichtsverlies optreedt doordat de muizen de eerste dag vrijwel niets eten of drinken. Deze muizen hebben beschikking over hoogcalorisch gewoont voer waarna ze geheel herstellen in gewicht. Ook vertonen ze geen afwijkend gedrag. De HEP van 15% is daarom verschoven naar 20%. Dit verlaagt de uitval in het model van de aanvrager.



Herberekening van de getallen uit het artikel ten opzichte van de MI operaties binnen onderzoeksinstelling:

Stam	Totaal (n)	Sham + grootte MI	MI operaties	Goede MI	Rupt+HF	Dood op tafel	Geen MI of <15%	Lichaamsgewicht
Balbc	64	14	50	24	3	9	14	0
C57/BL6	73	14	59	21	11	12	15	0
FVB	73	15	58	22	24	4	8	0
129S6	80	12	68	23	30	5	10	0
Swiss	64	13	51	27	8	7	9	0
FVB*			94	38	30	1	20	5

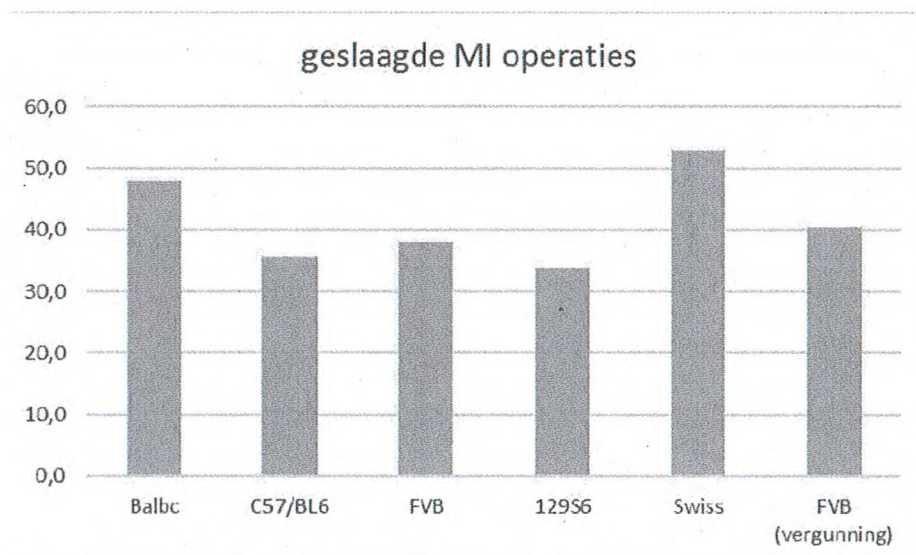
\*gegevens van model in FVB in eigen instelling

Herberekening van de geslaagde MI model percentages:

Stam	Goede MI	Rupt+HF	Dood op tafel	Geen MI of <15%	lichaamsgewicht
Balbc	48,0%	6,0%	18,0%	28,0%	0,0%
C57/BL6	35,6%	18,6%	20,3%	25,4%	0,0%
FVB	37,9%	41,4%	6,9%	13,8%	0,0%
129S6	33,8%	44,1%	7,4%	14,7%	0,0%
Swiss	52,9%	15,7%	13,7%	17,6%	0,0%
FVB*	40,4%	31,9%	11%	21,3%	5,3%

\*gegevens van model in FVB in eigen instelling

Hieronder zijn de herberekende percentages in een grafiek gezet waaruit duidelijk wordt dat er geen overduidelijke verschillen zijn tussen het succespercentage tussen de verschillende stammen.



\*EINDE COVER LETTER\*



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

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
- Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrek(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager 4 oktober 2018
- Datum
  - Gestelde vraag/vragen
  - *(Bij de tweede wijziging zijn geen aanvullende vragen gesteld door de DEC.)*  
De DEC heeft verduidelijking gevraagd over:
    1. De DEC vroeg zich af of er al resultaten verkregen zijn uit het onderzoek van de eerdere projectvergunning waarin genen tot overexpressie worden gebracht om de pacemaker functie te herstellen. En zo ja, wat zijn daar de eerste resultaten van en hoe sluiten deze aan bij de strategie van deze aanvraag.  
*Met het andere protocol zijn nog geen relevante resultaten verkregen. Daarnaast omvat het andere studieprotocol een wezenlijk andere aanpak (daar gaat het om overexpressie in cardiomyocyten terwijl het hier herprogrammering van fibroblasten betreft).*
    2. Bij de andere studies die aangehaald worden in de achtergrond (ref 7 en 8), vraagt de DEC zich af of deze studies al navolging hebben gekregen in een klinische studie? Zijn er al aanwijzingen dat deze aanpak in patiënten effectief zal zijn? De DEC wil een wat beter beeld krijgen van het stadium van het onderzoek ten opzichte van de klinische toepassing.  
*Dit onderzoek zit nog volledig in de preklinische fase waarbij de experimenten hoofdzakelijk zijn uitgevoerd in celkweekmodellen en in muizen.*
    3. U gebruikt een hartinfarctmodel om herprogrammering in de context van schade te onderzoeken. In de achtergrond wordt niet duidelijk dat hartritmestoornissen gepaard zouden gaan met schade. Kunt u verduidelijken hoe dit model aansluit op de doelstelling "ontwikkelen van therapie voor hartritmestoornissen". De DEC heeft nu namelijk de indruk dat er hartritmestoornissen in het algemeen bedoeld worden en niet alleen na een hartinfarct. Kunnen de resultaten uit deze LAD studie ook gebruikt worden voor hartritmestoornissen die ontstaan door ouderdom of aangeboren hartziekten?  
*De herprogrammeringsstrategie beoogt excessieve aanwezigheid van fibroblasten te gebruiken als cellulaire bron voor regeneratie. Dit overschot aan fibroblasten kan goed worden gesimuleerd door gebruik te maken van een infarctmodel. Aangezien excessieve fibrose ook een cruciale rol speelt in de genese van ritmestoornissen bij ouderdom en congenitale hartziekten, kan het door ons*



*gekozen infarctmodel ook goed gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor deze subtype van ritmestoornissen.*

4. De DEC verbaast zich over het jargon in deze NTS. Is deze versie publieksvriendelijk gemaakt of heeft de DEC per abuis een eerdere versie ontvangen?

*Dit was inderdaad niet de goede versie. De juiste versie is nu toegevoegd.*

De DEC heeft over de wijziging de volgende vragen gesteld:

**Bijlage 2:**

1. De DEC vindt de uitval van 50% ten opzichte van de eerder genoemde uitval van 15% erg hoog. Kunt u specificeren waar u de dieren verliest (Tijdens/na operatie/HEPs)?

De volgende data zijn gebaseerd op operaties uitgevoerd tijdens het afgelopen jaar in verschillende lijnen, allen in een FVB achtergrond. Er wordt gevraagd om het percentage uitval te specificeren, waarbij er onder andere gesplitst moet worden tussen ruptuur, ondergewicht en humane eindpunten.

Het ondergewicht en hartfalen valt onder de humane eindpunten.

Ruptuur en hartfalen wordt veroorzaakt door een groot infarct, vandaar dat ik deze bij elkaar heb geschaard.

Als er een berekening wordt gemaakt waarbij de uitval op 100% wordt gezet, dan zijn de percentages als volgt:

Uitval totaal	100%	
Uitval tijdens operatie:	2.9%	
Uitval na operatie door ruptuur/hartfalen:		46.4%
Uitval door ondergewicht:	8.7%	
Uitval klein/geen infarct:	42.0%	

2. De DEC heeft vernomen dat het hoge uitvalpercentage deels te wijten is aan de achtergrond van de stam die u gebruikt: de FVB muis. De uitval zou bij muizen op een Bl/6 achtergrond kleiner kunnen zijn. De DEC wil graag een onderbouwing waarom u er niet voor kiest om uw transgene lijnen terug te kruisen op deze achtergrond.

Naar aanleiding van uw vraag hebben we gekeken naar het effect van MI op verschillende WT muizen. Uit het artikel van [10.2 .e. en g](#) ) blijkt dat BalbC het beste beschermd is tegen ruptuur en hartfalen. We staan er welwillend tegenover om te onderzoeken of het gebruik van BalbC een goed alternatief zou zijn voor FVB. Dit zouden we graag eerst aan de hand van een pilot experiment willen bekijken, waarbij wildtype FVB en wildtype BalbC door ons met elkaar vergeleken worden tav de post-operatieve mortaliteit en reprogramming efficiency. Als uit deze experimenten blijkt dat BalbC muizen inderdaad significant minder post-operatieve sterfte vertonen en wanneer de reprogramming efficiency vergelijkbaar is met de resultaten in FVB muizen, dan zouden we onze studie deels kunnen vervolgen in wildtype BalbC muizen. Voor aanvullende studies waarbij het gebruik van de verschillende transgene reporters essentieel is zullen we dan nog steeds aangewezen zijn op de FVB achtergrond waarin deze transgene muizen gemaakt zijn. Afhankelijk van het totaal aantal te verwachten experimenten zullen we dan overwegen om een of meerdere van deze reporter-muizen om te zetten naar de BalbC achtergrond. Dit zou dan op basis van het bovengenoemde artikel tot substantieel minder uitval leiden.

Mocht de DEC eens zijn met deze pilot, dan zouden we deze willen uitvoeren met 20 muizen per lijn, totaal 40 muizen. Uit het artikel van [10.2 .e. en g](#) ) blijkt



dat 5% van BalbC uitvalt door ruptuur+hartfalen. Dit zou bij 20 muizen opereren tot 1 muis uitval moeten leiden. De uitval bij FVB is dit 33%. Met deze aantallen kan er ook een verschil in efficiëntie van het herprogrammeren worden gevonden, mocht dat er zijn.

Deze vergelijking bleek achteraf niet juist. De uitval in 96 MI operaties in een FVB achtergrond binnen het instituut zijn vergeleken met de getallen genoemd in het artikel van 10.2 .e. en g. Hierbij zijn de getallen in het artikel herberekend met dezelfde definitie voor uitval. Er bleek toen geen groot verschil meer te zijn tussen verschillende stammen.

3. De DEC vraagt zich af waarom u een verhoging van het aantal dieren nodig heeft. Bent u nog steeds van plan om 12 "eigen" combinaties in genterapie te testen na een hartinfarct? Kunt u ook onderbouwen waarom u in plaats van één experiment met een gepubliceerde gencombinatie er nu vijf wilt uitvoeren?

De verhoging van het aantal dieren komt overwegend door de verhoging van het uitvalspercentage ten opzichte van de initiële aanvraag. In de initiële aanvraag is een verkeerd percentage voor de uitval aangehouden. Aangezien dat percentage niet realistisch is, moet er dus nu om meer dieren gevraagd worden om hetzelfde aantal therapieën te testen. Daarnaast is het aantal genterapieën dat getest zal worden op basis van de literatuur (dus niet voorkomend uit onze in vitro screening experimenten) verhoogd van 1 naar 5 groepen.

Er is al een combinatie gepubliceerd die we in vivo willen gaan testen en met maar 1 groep gereserveerd voor een combinatie uit de literatuur zouden we niet meer de mogelijkheid hebben om nieuwe (nog niet gepubliceerde) combinaties te testen. De gepubliceerde gen combinaties worden vergeleken met de eigen combinaties om op deze manier iets te zeggen over de effectiviteit.

- Datum antwoord 5 oktober 2018/9 juli 2019
- Verstrek(e) antwoord(en) De antwoorden zijn direct onder de gestelde vragen geplaatst.
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag  
Het aangepaste projectvoorstel en de juiste NTS zijn opnieuw ingediend door de IvD. De wijziging heeft geleid tot aanpassingen in het projectvoorstel, bijlage 2 en in de NTS.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*

>ja



2. De aanvraag betreft een ~~nieuwe aanvraag~~ / een wijziging op een bestaande vergunning. Dit betreft een wijziging op de vergunning met het aanvraagnummer AVD<sup>02.e.enb</sup> 20171885. Dit betreft een tweede wijziging.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?  
>ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.  
>nee

## C. Beoordeling (inhoud)

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

De hoofddoelstelling van deze aanvraag is concreet en helder beschreven: "de ontwikkeling van klinisch toepasbare biologische pacemakers als therapie voor hartritmestoornissen bij de mens." Er zijn twee onderzoeksvragen:

1. Welke (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen zijn het meest efficiënt voor 10.1 c en 10.2 g

?

2. Kan ook in vivo herprogrammering van hart fibroblasten worden bereikt met de meest effectieve combinaties uit Subdoel 1 en met eerder gepubliceerde gencombinaties?

De relatie tussen het hoofddoel en de twee onderzoeksvragen is logisch en navolgbaar. Het project lijkt op voorbeeld 1 in de handreiking "invulling definitie project". Het onderzoek naar de combinatie van transcriptiefactoren en kleine moleculen in vitro en in vivo zijn tijds- of uitkomstafhankelijk van elkaar. Het onderzoek is volledig en duidelijk uitgewerkt waardoor de mate van ongerief en de dieraantallen duidelijk zijn, waardoor de aanvraag toetsbaar en navolgbaar is.

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).  
n.v.t.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.  
De aanvrager heeft de doelcategorieën "fundamenteel" en "translationeel" aangekruist. De DEC is van mening dat dit aansluit bij de hoofddoelstelling omdat dit onderzoek kan leiden tot het identificeren van de belangrijkste transcriptie factoren en kleine moleculen die bijdragen aan het genetisch herprogrammeren van fibroblasten naar functionele pacemaker- en geleidingscellen van het hart. Dit deel wordt als fundamenteel onderzoek gezien. Deze genetische herprogrammering wordt daarna onderzocht als potentiële therapie na een hartinfarct in een muizenmodel.

### *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 ("10.1 c en 10.2 g

") heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (de ontwikkeling van klinisch toepasbare biologische pacemakers als therapie voor hartritmestoornissen bij de mens). De DEC acht het onderzoek naar het genetisch herprogrammeren van hartfibroblasten, gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. Resultaten uit eerdere onderzoeken hebben laten zien dat het *in vitro* mogelijk is om fibroblasten genetisch te herprogrammeren tot myocardcellen en dat dit *in vivo* gevalideerd is, waarbij is aangetoond dat de hartspier regenereerde. Daarnaast heeft recent onderzoek aangetoond dat het mogelijk is om cardiomyocyten te herprogrammeren tot pacemaker cellen.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)  
De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project, zijn de proefdieren, de onderzoekers en in mindere mate de hartpatiënten. De dieren kunnen licht ( $3940/7180: 71\%$   $3940/7220: 55\%$ ) of matig ( $1648/5692: 29\%$   $3280/7220: 45\%$ ) ongerief ervaren door dit onderzoek. Met dit onderzoek zullen de onderzoekers hun kennis en inzichten vergroten over de mogelijkheden om fibroblasten genetisch te herprogrammeren tot pacemaker- en geleidingscellen na een hartinfarct, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties. De patiënten hebben op termijn een belang omdat de inzichten die dit onderzoek zal opleveren, een bijdrage kan leveren aan een nieuwe behandeling van hartritmestoornissen.
6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?  
De DEC heeft geen aanleiding om te vermoeden dat er schadelijke effecten op het milieu zouden zijn. De geïsoleerde weefsels worden in een gesloten container verplaatst naar het ML1 lab voor verdere verwerking.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).  
De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.  
De aanvragers hebben jarenlange ervaring met de isolatie van fibroblasten uit muizen en met het LAD (hartinfarct) model. De DEC oordeelt op basis hiervan dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen voldoende gewaarborgd zijn.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).



Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstelling. *In vitro* wordt eerst onderzocht welke combinaties van transcriptiefactoren en kleine moleculen het meest efficiënt zijn in de genetische herprogrammering van hartfibroblasten tot pacemaker- en geleidingscellen. Er worden fibroblasten van verschillende bronnen gebruikt. Eerst in embryonale fibroblasten, vervolgens in neonatale cardiofibroblasten en ten slotte ook in volwassen staartfibroblasten. Vervolgens wordt in een muizenmodel voor een hartinfarct de herprogrammering van fibroblasten in vivo gevalideerd. Er wordt gebruik gemaakt van fluorescerende reportereiwitten om de herprogrammering te volgen. De in vitro stap naar geschikte factoren kan worden overgeslagen, als er in de literatuur factoren gepubliceerd worden die een grote efficiëntie vertonen om pacemakercellen te induceren. Deze zullen direct in het in vivo hartinfarct model onderzocht worden. In de wijziging is het aantal experimenten met gepubliceerde combinaties verhoogd van één naar vijf. De DEC heeft overwogen of het toepassen van de therapie direct na aanbrengen van het hartinfarct een goed model zou zijn voor de klinische situatie. De DEC vroeg zich af of er niet gewacht zou moeten worden totdat er meer fibroblasten aanwezig zouden zijn. Als dieren pas enige tijd, bijvoorbeeld een dag, na het infarct de therapie zouden krijgen, moet de wond weer opengemaakt worden voor de injectie in het hart. Dit zou leiden tot meer ongerief van het dier. Bovendien hebben de eerdere resultaten laten zien dat de herprogrammering in vivo zelfs efficiënter is dan in vitro. Dit suggereert dat het virus voldoende lang aanwezig blijft om de fibroblasten te kunnen transduceren met transcriptie factoren. De DEC is van mening dat op deze manier een "proof of concept" verkregen kan worden en dat dit een gerechtvaardigde aanpak is, in dit stadium van het onderzoek. De gekozen strategie en de experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling gesteld binnen het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).
- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e, lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)
- Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Er wordt voldaan aan bijlage III voor de huisvesting. Gedurende de eerste 24 uur na de operatie worden de dieren individueel gehuisvest voor optimaal herstel. De DEC vindt deze reden voldoende onderbouwing voor het individueel huisvesten voor



maximaal 24 uur. In deze aanvraag worden muizen op een FVB achtergrond gebruikt. Deze hebben de neiging om sneller te gaan vechten in vergelijking met andere stammen. In dit onderzoek blijkt dit ook het geval te zijn. Mannelijke muizen kunnen na het herstel niet meer sociaal gehuisvest worden. Er is daarom besloten om voor korte proeven nog wel mannelijke en vrouwelijke dieren te gebruiken, maar de mannen na herstel niet meer sociaal te huisvesten. De mannelijke muizen worden dus maximaal 3 weken alleen gehuisvest.

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

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. Een gedeelte van de muizen (~~4044/5692: 71%~~3940/7220:55%) ondergaat licht ongerief doordat ze gedood worden om embryo's of om fibroblasten te isoleren voor het in vitro onderzoek. Het andere gedeelte van de dieren (~~1648/5692: 29%~~3280/7220:45%) ondergaat matig ongerief door een combinatie van de operatie om een hartinfarct te induceren, de injectie van virussen in de hartspier en het herstel hiervan.

**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 wordt aangetast doordat ze óf gedood worden voor het verzamelen van embryo's of de fibroblasten óf doordat ze een operatie krijgen om een hartinfarct na te bootsen en daarbij injecties in het hart met virussen om het genetisch materiaal over te brengen. Uiteindelijk worden ook deze dieren gedood voor verdere analyse.

**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).**

Voor de dieren die gedood worden voor het verzamelen van fibroblasten zijn geen humane eindpunten geformuleerd. De DEC sluit zich aan bij de aanvrager dat er geen omstandigheden zijn waarbij het toepassen van HEPs het ongerief van de dieren zou kunnen beperken. De criteria voor de dieren waarin een hartinfarct veroorzaakt wordt bestaan uit (1) bloedingen uit de wond en infectie van het wondgebied die nog aanwezig zijn na 1-2 dagen na operatie, (2) het vertonen van symptomen van ritmestoornissen na de operatie en/of meer dan 15% van hun hoogst gemeten lichaamsgewicht óf 8% binnen één dag hebben verloren, (3) ~~het optreden van ademnood ("dyspnoe") omdat dit vaak vooraf gaat aan een acute hartdood.~~ De aanvrager verwacht dat 15% van de dieren kans loopt om deze criteria te halen. Gezien de bestaande ervaring met dit model, heeft de DEC geen reden om te twijfelen aan dit percentage.

Het HEP bij verlies van 15% lichaamsgewicht blijkt uit een pilotproef van een andere onderzoeksgroep te streng. In deze pilot bleek dat dieren die 15% waren afgevallen vervolgens niet meer afvielen dan 20% en bovendien net zo snel herstelden als muizen die minder dan 15% waren afgevallen. Uit deze pilot bleek ook dat de muizen de eerste dag na de operatie niet eten of drinken maar zodra ze weer gingen eten en drinken, de dieren snel herstelden in gewicht. Er waren verder geen andere afwijkende uiterlijke kenmerken van ongerief te zien bij muizen die >15% gewichtsverlies hadden. Het verschuiven van het HEP naar 20% leidt daarom tot minder uitval van dieren en het is aannemelijk gemaakt dat het niet leidt tot meer ongerief t.o.v. het HEP bij 15% gewichtsverlies (zie coverletter bij wijziging).



3V's

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

De aanvrager geeft aan dat voordat biologische pacemakers in patiënten toegepast kunnen worden, dit eerst in een proefdiermodel voor een hartinfarct onderzocht worden. In de NTS wordt aangegeven dat de herprogrammering in het hart in de setting van herstel na een hartinfarct niet in celkweeken kan worden getest. Voor het voorafgaande in vitro onderzoek moeten primaire fibroblasten gebruikt worden omdat commerciële fibroblastcellijnen door de immortalisatie niet geschikt zijn om genetische herprogrammering in te bestuderen. De DEC is van mening dat de aanvrager het voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte proefdiervrije vervangingsalternatieven zijn.

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*).

De aanvrager heeft de berekening voor het aantal proefdieren voor het in vitro gedeelte ingeschat op basis van ervaring. Er worden 5 optimalisatie rondes uitgevoerd om de beste combinaties te identificeren. Er is rekensom gemaakt hoeveel dieren hiervoor nodig zijn. De berekening van het aantal dieren dat behandeld wordt met een combinatie van transcriptiefactoren en kleine moleculen na een hartinfarct is gebaseerd op een powerberekening met een power van 0.8 en een  $\alpha$  van 0.05 in een T test en op basis van een s.d. van 1.6% en een effect van 3% af- of toename van de pacemaker of geleidingscellen. Er zouden dan 5 dieren per groep nodig zijn. De DEC oordeelt dat de gemaakte schatting realistisch is. De hieruit volgende rekensom voor de maximaal 12 verschillende combinaties is navolgbaar.

Het aantal benodigde dieren voor de tweede bijlage (behandeling na hartinfarct) is verhoogd van 1648 dieren naar 3280 dieren. Deze verhoging wordt veroorzaakt door de volgende veranderingen in het project:

- a) De uitval van dieren is verhoogd van 15% naar 50%, er wordt met een groter aantal dieren gestart om uiteindelijk voldoende dieren voor de uiteindelijke analyse te hebben;
- b) Er zijn meer dieren nodig om alle bepalingen uit te kunnen voeren. In het originele projectvoorstel werd gedacht dat de verschillende bepalingen op hetzelfde hart uitgevoerd konden worden. Dit blijkt niet altijd het geval te zijn. De aanvragers hebben nu het aantal dieren verhoogd om, indien nodig, de bepalingen op aparte harten te kunnen uitvoeren;
- c) Het aantal testgroepen is ook verhoogd omdat ze meer reeds gepubliceerde combinaties van transcriptie factoren willen onderzoeken in het hartinfarct model (van 1 naar 5 groepen).

Daarnaast is de schatting van het aantal benodigde dieren ook op sommige punten juist verlaagd. In de originele vergunning zouden er vier transgene lijnen onderzocht worden, dit is bijgesteld naar gemiddeld twee lijnen en het aantal tijdstippen van vijf naar gemiddeld twee tijdstippen. De DEC heeft aan de aanvrager gevraagd naar de mogelijkheden om het uitvalpercentage te verlagen door een stam te gebruiken waarbij minder uitval mogelijk is. De aanvrager heeft een pilot opgenomen om te onderzoeken of dit in de Balb/c muis minder zal zijn. De Balb/c is beschreven als de meest resistente stam voor uitval na een MI operatie door ruptuur en hartfalen. Als deze stam inderdaad bruikbaar blijkt voor dit onderzoek kan dit veel dieren besparen.

Na een uitgebreide analyse van de beschikbare gegevens over uitval bij myocardinfarctoperaties in de FVB stam binnen het onderzoeksinstituut en het uitvoeren van dezelfde berekening van uitval met de gegevens uit het artikel, blijkt de uitval in de verschillende stammen zeer vergelijkbaar te zijn. De IvD vindt daarom een



pilot waarbij 40 dieren van een andere stam geopereerd gaan worden niet meer verantwoord. De DEC heeft deze analyses bekeken en kan zich vinden in de conclusie van de IvD dat een pilot in een andere stam niet zal resulteren in een lagere uitval. Gezien deze uitkomst vindt de DEC het aantal dieren realistisch ingeschat.

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

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

- 1) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven optimaal uit te voeren;
- 2) de onderzoeksstrategie erop gericht is om de beste combinaties eerst *in vitro* vast te stellen voordat de combinaties worden onderzocht op hun potentie om het herstel na een hartinfarct in muizen te verbeteren. Ook worden er combinaties gebruikt waarvan al reeds bekend is dat ze een goede efficiëntie hebben om pacemaker cellen te induceren. Hierdoor wordt het aantal dieren dat deze operatie zal ondergaan zoveel mogelijk beperkt;
- 3) de muizen na de operatie goed gemonitord worden of ze goed herstellen en wordt er pijnbestrijding gegeven. Zo wordt het ongerief door de operatie zoveel mogelijk beperkt.

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.  
n.v.t.

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

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

Er zal in dit onderzoek gebruik gemaakt worden van vrouwelijke en mannelijke dieren. Uit ervaring blijkt nu dat de mannelijke proefdieren met elkaar gaan vechten als ze na het herstel van de operatie weer sociaal gehuisvest worden. Dit heeft als consequentie dat er geen mannelijke dieren gebruikt zullen worden voor de langere proeven (langer dan 3 weken). Voor langer durende proeven zullen alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden om ongerief door solitaire huisvesting bij de mannelijke proefdieren te voorkomen. De DEC heeft geen bezwaar tegen deze aanpassing om zo ongerief door vechtwonden en solitaire huisvesting bij mannelijke proefdieren te voorkomen.

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

De dieren worden in het kader van het onderzoek gedood om fibroblasten te kunnen gebruiken voor onderzoek of om het herstel van het hartinfarct te kunnen



onderzoeken. Er wordt een dodingsmethode gebruikt die passend is voor de muis die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn 2010/63/EU.

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?  
Ja, de NTS is een evenwichtige weergave van het project. De DEC vond dat in de NTS jargon gebruikt werd. Bij navraag bij de aanvrager bleek de verkeerde versie ingediend te zijn. De versie die op publieksvriendelijk taalgebruik gecontroleerd was, is alsnog naar de DEC en de CCD gestuurd. Deze versie is wel begrijpelijk geformuleerd.

## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).  
Rechtvaardigt de ontwikkeling van klinisch toepasbare biologische pacemakers als therapie voor hartritmestoornissen bij de mens, het gebruik van 5692 7220 muizen die licht (55%) of matig (45%) ongerief zullen ondergaan in dit onderzoek?

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van klinisch toepasbare biologische pacemakers zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op de langere termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met een hartinfarct of met hartritmestoornissen. In Europa wordt jaarlijks bij ongeveer 700.000 patiënten een pacemaker geïmplant. Er zijn verschillende nadelen aan een pacemaker. Op termijn zal dit onderzoek bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische toepassing voor het herstellen van hartritmestoornissen d.m.v. biologische pacemakers. De toepassing van deze kennis in patiënten valt buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie. De belangen van de patiënten zijn daarom voor dit project beperkt aanwezig.

De muizen worden direct door dit onderzoek geschaad. De muizen worden óf gedood zonder voorafgaande handelingen óf ondergaan een operatie om een hartinfarct te induceren en een behandeling. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties.



Hoewel maximaal ~~5692~~ 7220 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte nuttige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang (het identificeren van belangrijke transcriptie factoren en kleine moleculen om het pacemaker- en geleidingsstelsel van het hart te regenereren, om zo een therapie te kunnen ontwikkelen tegen hartritmestoornissen). De DEC waardeert de bijdrage aan de ontwikkeling van biologische pacemakers voor patiënten met hartritmestoornissen als de meest zwaarwegende waarde die tegen het gebruik en het ongerief van maximaal ~~5692~~ muizen opweegt.

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

### **Reparatie van het pacemaker- en geleidingsstelsel door genetische herprogrammering**

De DEC is van mening dat *de ontwikkeling van klinisch toepasbare biologische pacemakers als therapie voor hartritmestoornissen bij de mens*, het gebruik en het lichte (~~4044/5692: 71%~~ 3940/7220:55%) en matige (~~1648/5692: 29%~~ 3280/7220:45%) ongerief dat ~~5692~~ 7220 muizen zullen ondergaan in dit onderzoek, rechtvaardigt.

In Europa wordt jaarlijks bij ongeveer 700.000 patiënten een pacemaker geïmplantéerd om hartritme stoornissen te verhelpen. Pacemakers kennen nog verschillende nadelen. Ze moeten om de zeven jaar vervangen worden, ze passen zich niet aan bij een verhoogde lichaamsactiviteit, het functioneren van het hart (kamer) gaat achteruit doordat de stimulus vanuit een andere plaats in het hart komt en er zijn bijkomende complicaties door het gebruik van lichaamsvreemd materiaal. Biologische pacemakers vormen een aantrekkelijk alternatief om deze beperkingen te overwinnen. In deze aanvraag wordt onderzoek gedaan hoe fibroblasten in het hart geherprogrammeerd kunnen worden tot pacemaker- en geleidingsstelsel cellen in het hart. Met behulp van retrovirale vectoren worden transcriptiefactoren tot expressie gebracht in fibroblasten in het hart. In dit onderzoek wordt bepaald welke combinatie van transcriptiefactoren en ondersteunende kleine moleculen het efficiëntst is om de meeste pacemakercellen en geleidingsstelsel cellen uit deze fibroblasten te laten ontstaan. De DEC acht het aannemelijk dat de doelstellingen binnen de kaders van het project behaald zullen worden. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Het beantwoorden van deze onderzoeksvragen kan niet in een proefdier-vrij alternatief. Er kunnen geen commerciële fibroblast cellijnen gebruikt omdat deze teveel genetisch afwijken door het immortalisatie proces. De strategie om eerst in embryonale fibroblasten, dan in cardiofibroblasten en vervolgens in staartfibroblasten de herprogrammering te bestuderen is helder en logisch verwoord. Het proefdiermodel met het hartinfarct is noodzakelijk om te onderzoeken of de genetische herprogrammering ook plaats kan vinden in beschadigd hartweefsel na een hartinfarct en om te onderzoeken of deze expressie stabiel blijft bestaan tijdens het herstel. Excessieve fibrose speelt ook een cruciale rol in het ontstaan van ritmestoornissen bij ouderdom en congenitale hartziekten, waardoor resultaten met het infarctmodel ook gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor deze subtypen van ritmestoornissen. Deze



studie wordt verricht in mannelijke en vrouwelijke proefdieren. Al worden bij de langer durende proeven alleen vrouwelijke dieren gebruikt. De achtergrond van de muizenstam die gebruikt wordt in dit onderzoek staat er om bekend dat ze sneller vechtgedrag vertonen dan andere stammen. Mannelijke muizen kunnen na de operatie niet meer samen gehuisvest worden. Om het ongerief door solitaire huisvesting van de mannelijke muizen te voorkomen, worden dan enkel vrouwelijke dieren gebruikt. Voor de kortere proeven (tot maximaal 3 weken) worden nog wel beide geslachten gebruikt. De DEC heeft nog besproken of de moederdieren die de neonatale dieren voortbrengen om fibroblasten uit te isoleren, ook meegewogen moesten worden. Uiteindelijk zijn deze dieren niet meegewogen omdat alle proefdieren geboren worden en moederdieren bij andere dierstudies ook niet meegewogen worden. De moederdieren krijgen zelfs minder nestjes (maximaal 3 nestjes) dan in een normale fok wordt toegestaan. Het cumulatieve ongerief van de proefdieren in deze studie is juist ingeschat.

De DEC heeft de verhoging van het aantal dieren door het bijstellen van het uitvalpercentage van 15% naar 50% uitgebreid besproken. Dit blijkt voor een groot deel veroorzaakt te worden door de FVB achtergrond van de genetisch gemanipuleerde lijnen. De DEC heeft de aanvrager gevraagd te verduidelijken waarom er niet teruggekruist kan worden naar een stam met minder uitval. De aanvrager stelt voor om een pilot doen met de Balb/c om te onderzoeken of de uitval zo verlaagd kan worden. Indien de Balb/c bruikbaar is voor dit onderzoek zal overwogen worden of het terugkruisen van transgene lijnen op een Balb/c achtergrond opweegt tegen het verlagen van uitvalpercentage met betrekking tot het besparen van het aantal proefdieren. Behalve als het terugkruisen van de transgene lijn meer dieren kost dan de verwachte uitval voor de benodigde proeven, dan is de DEC akkoord met de proeven op een FVB achtergrond. In alle andere gevallen zou de DEC adviseren om de stam te gebruiken met de minste uitval. Vanuit de IvD 102 is er een MI overleg georganiseerd met verschillende MI onderzoekers in Nederland om zo te leren van elkaars ervaringen om de uitval in deze modellen zoveel mogelijk te kunnen beperken. De aanvrager is ook betrokken bij dit overleg. De DEC waardeert zeer dat de aanvrager het model wil verfijnen om op deze wijze het uitvalpercentage te verlagen. Dit zou het aantal benodigde dieren kunnen verminderen.

De herberekening van uitval in MI operaties in verschillende stammen geeft aan dat dit model een vergelijkbare uitval heeft in verschillende stammen. De DEC kan zich vinden in de conclusie dat een pilot in een andere stam niet zal leiden tot een lager uitvalpercentage. De aanvrager refereert aan pilot data van een andere onderzoeksgroep waarin een HEP van 15% gewichtsverlies is vergeleken met een HEP van 20%. Hieruit bleek dat 15% een te strenge grens is waardoor muizen te snel uit de proef worden genomen. De DEC beoordeelt het HEP van 20% gewichtsverlies als een betere maat omdat de uitval op deze wijze beperkt wordt én omdat de dieren geen additioneel ongerief zullen ondergaan gezien het herstel en het ontbreken van andere uiterlijke kenmerken van ongerief (zie ook C13 en de coverletter bij de wijziging).

De uiteindelijke maatschappelijke impact van deze studie is moeilijk in te schatten op dit moment. Het is immers afhankelijk van de uitkomsten van deze studie of deze studie uiteindelijk zal leiden tot een nieuwe therapie.

De DEC is van mening dat het onderzoek naar de beste combinatie van transcriptiefactoren en kleine moleculen om biologische pacemakers te induceren na een hartinfarct bijdraagt en noodzakelijk is voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door het gebruik van powerberekeningen en de voorgestelde proefopzet. Dit onderzoek maakt geen gebruik van bijzondere categorieën dieren of dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

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



## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificiceer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*). Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

### 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*). Er waren geen knelpunten of dilemma's. De DEC vond het lastig om een ethische weging te verrichten met een model waarvan de helft van de dieren die geopereerd worden om een hartinfarct te induceren, niet bruikbaar is voor het daadwerkelijke onderzoek. De DEC waardeert de inspanning van de onderzoeker om het uitvalspercentage te verlagen, en brengt gezien de verwachte opbrengsten daarom toch een positief advies uit voor deze wijziging. (De DEC heeft meegewogen dat de relatieve grote uitval bij dit model hoort, en is van mening dat de verwachte opbrengsten van het project opwegen tegen het gebruik en het ongerief van deze aantallen dieren.)



## **Bijlage I: Voorbeelden**

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

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

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

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

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

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

- C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."
- C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal



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

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

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

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

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

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

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

## **D. Ethische afweging**

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



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

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

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

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel

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

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

## **E. Advies**

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





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

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

### Onze referentie

Aanvraagnummer  
AVD [redacted] 0171885-2

Datum 12 november 2019

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Wij hebben op 11 oktober 2019 een aanvraag tot wijziging ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om uw project "Reparatie van het pacemaker en geleidingssysteem middels herprogrammering" met aanvraagnummer AVD [redacted] 0171885, waarvoor op 22 november 2018 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD [redacted] 0171885-2. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u de doelstelling te behalen door het aantal benodigde dieren voor de tweede bijlage (behandeling na hartinfarct) te verhogen van 1648 dieren naar 3240 dieren. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

### Beslissing

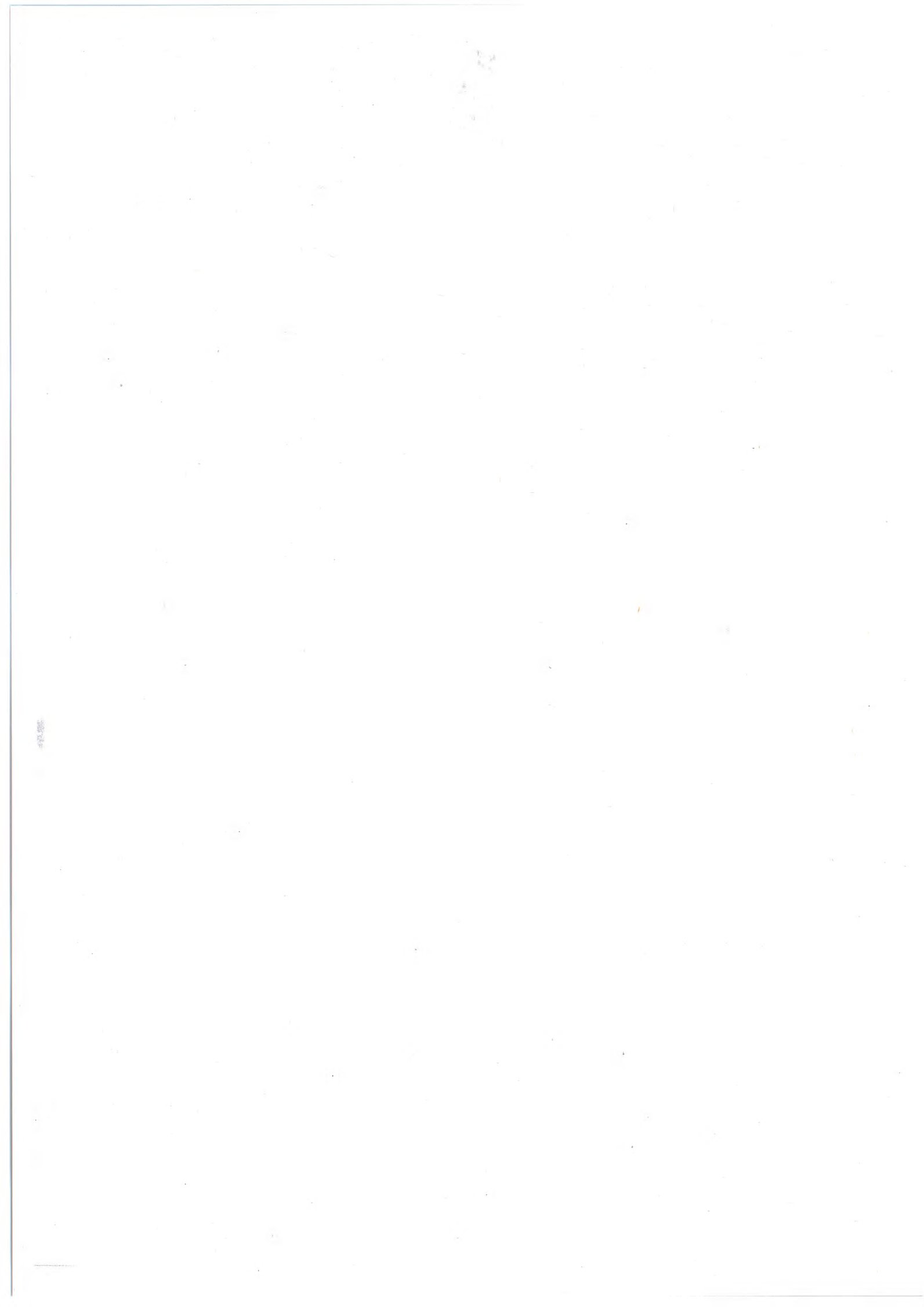
Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven aanpassingen onder de vergunning voor het project "Reparatie van het pacemaker en geleidingssysteem middels herprogrammering" uit te voeren.

### Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie [redacted] (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 28 oktober 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.







### Vergunning

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen onderstreept):

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.2 <i>In vivo</i> herprogrammering; validatie in myocardinfarct muizen	muizen	<del>1648</del> +1592=3240	100% matig

Datum  
12 november 2019

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD-20171885-2

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.  
U dient deze brief te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

### 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 93118, 2509 AC, Den Haag.

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

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

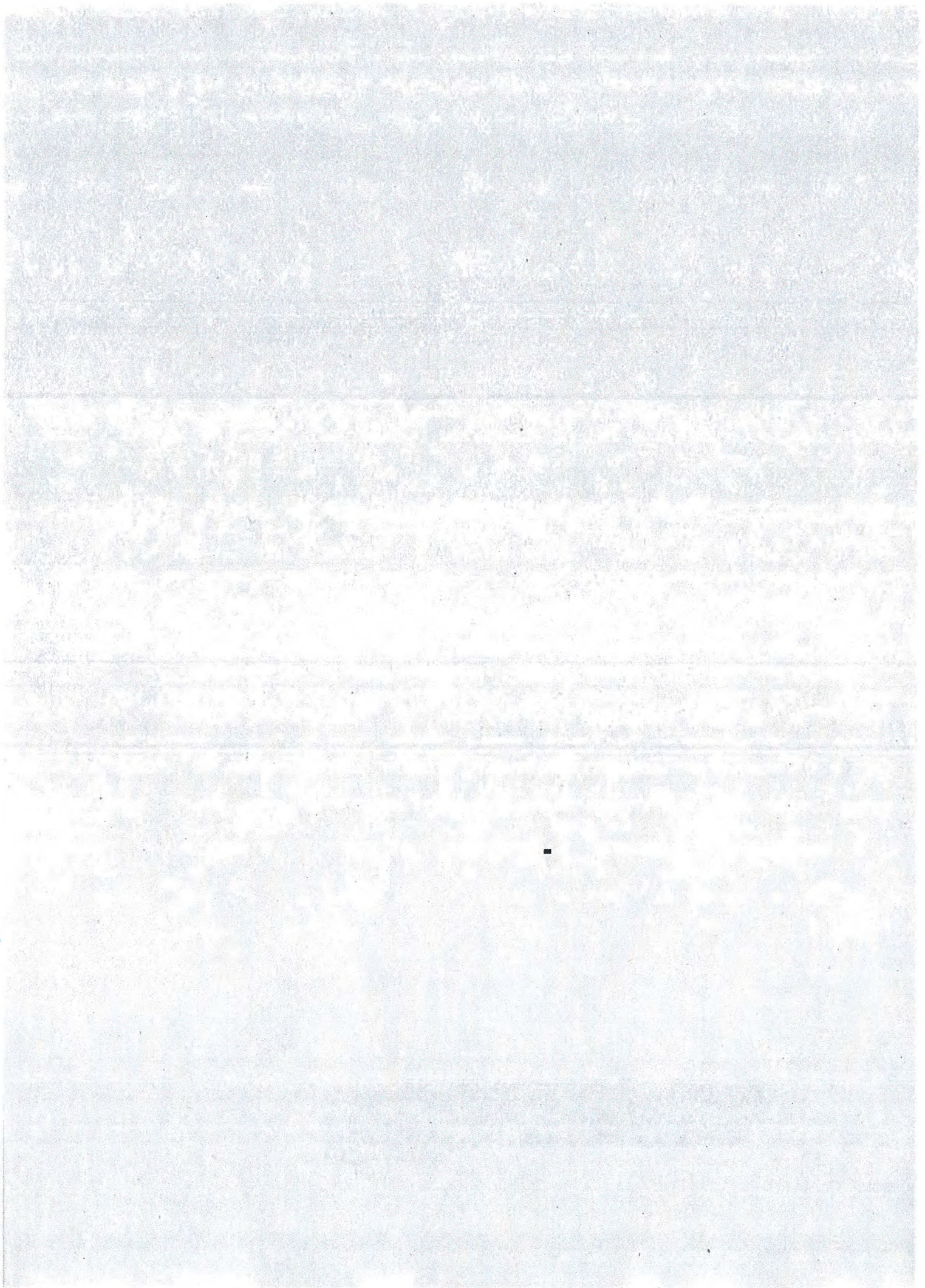
De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Drs. F. Braunstahl

10.2 .e. en g

Bijlage  
- DEC-advies









## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Recent genetisch onderzoek heeft aangetoond dat variatie in DNA sequenties van het genoom



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

Terwijl GWAS studies het grote belang van regulatoir DNA voor ziekteprocessen in de mens onweerlegbaar hebben vastgesteld, laten deze studies niet zien 1) welke specifieke varianten de ziektekans beïnvloeden en 2) hoe deze varianten de functie van organen beïnvloeden (E Callaway, Nature 546 (2017) 463). Daarnaast is de functie van dat regulatoire DNA in de regulatie van genexpressie, orgaanontwikkeling, homeostase en ziekteverloop na hartschade nog nauwelijks begrepen. Een belangrijk aspect hierbij is dat het onbekend is welke genen door de regulatoire elementen (uit de GWAS) worden gereguleerd en op welke manier, terwijl juist deze kennis nodig is voor het begrip van het ziektemechanisme en eventueel daaruit voorkomende aangrijpingspunten oplevert voor voorspelling, diagnose of behandeling.

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

Volgens de laatste inzichten worden deze hartziekten veroorzaakt door een combinatie van verschillende mutaties/varianten in genen en regulatoire DNA elementen, al dan niet in samenspel met omgevingsfactoren. Daarnaast is er een onverwacht grote overeenkomst gevonden in de genen en variatiegebieden die geassocieerd zijn met hartontwikkeling, ritmestoornissen en hartziekten. Zo veroorzaakt variatie in de elementen rond het gen voor de transcriptiefactor TBX5 boezemfibrilleren en geleidingsvertraging, veroorzaken heterozygote mutaties in TBX5 Holt-Oram syndroom (aangeboren hartafwijkingen) en ritmestoornissen, en veroorzaken homozygote mutaties in TBX5 volledige verstoring van hart en geleidingssysteem ontwikkeling (V10.2.e.eng). Dit voorbeeld laat ook het grote dosis afhankelijke effect zien van een en hetzelfde genproduct op het fenotype. Een ander voorbeeld van een gen gevonden in Genome Wide Association Studies (GWAS) dat betrokken is bij hartritmerregulatie en hartontwikkeling is 10.1.c en 10.2.g 1 (10.1.c en 10.2.g). Deze factor is tevens een klinisch relevante biomarker voor hartfalen. Wanneer het gen volledig wordt uitgeschakeld ontstaan hartafwijkingen (10.2.e.eng), maar wanneer het gen alleen in endocard cellen wordt uitgeschakeld, ontwikkelen de muizen ritmestoornissen, mitraalklep afwijkingen en hartfalen (10.2.e.eng). Wanneer 10.2.e.eng in de cardiomyocyten wordt uitgeschakeld ontwikkelen de muizen normaal maar gaan ze binnen enkele dagen na een geïnduceerd hartinfarct plotseling dood. Dit snelle beloop van de ziekte kan worden ondervangen door een collageen-patch geïmpregneerd met 10.2.e.eng eiwit op het infarct aan te brengen (10.2.e.eng). GWAS hebben genetische varianten geïdentificeerd die een verband laten zien tussen hartinfarct en ventriculaire ritmestoornissen (10.2.e.eng).

Hartontwikkeling en herstel na een hartaanval liggen in elkaars verlengde. In muizenpups tot een leeftijd van 7 dagen na de geboorte regeneert het hart volledig na een hartinfarct of apex resectie (10.2.e.eng). Ook in de mensen lijkt deze regeneratieve response tijdens de eerste levensjaren te bestaan, aangezien een baby met een massief hartinfarct herstelde zonder enige restschade (Haubner et al., Circ Res 2016). In oudere dieren is deze regeneratieve response sterk verlaagd, waardoor in het infarct niet voldoende nieuwe hartspiercellen worden gevormd maar een litteken (Poss & Tzahor, Science 2017). Volwassen hartspiercellen blijken wel terug te vallen op hartontwikkelingsmechanismen, maar



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

De muis is een goed model voor het bestuderen van genetische factoren die een rol spelen bij de ontwikkeling van organen zoals het hart, en bij ziektes zoals hart- en vaatziekten. Daarbij kunnen ziektes en aangeboren afwijkingen in de mens veroorzaakt door modificaties in het genoom gemodelleerd worden in genetisch gemodificeerde muizen. Recent hebben we gevonden dat een enkele nucleotide variant (rs6801957) die veel voorkomt in de populatie (4 op de 10 mensen zijn heterozygote drager) de activiteit van een regulator element van **10.1 en 10.2 g** (gen voor belangrijkste natriumkanal in het hart) verstoort. Hierdoor bleek de expressie van **10.1 en 10.2 g** verlaagd te worden en de gevoeligheid voor ritmestoornissen toe te nemen (**10.2 e. en g**). Dit onderzoek illustreert het translationele karakter van dit fundamentele onderzoek. Van een variant uit GWAS studies (mens) wordt in in vitro en in diersmodellen (muis) vastgesteld dat, en vervolgens hoe, deze de functie van het hart beïnvloedt. Momenteel wordt bekeken of de variant in de kliniek kan worden meegenomen in de risicobepaling voor bepaalde fatale ritmestoornissen. Dit onderzoek vond noodzakelijkerwijs deels plaats in muizenmodellen, omdat deze elementen functioneren in een strikt weefsel en context afhankelijke manier die niet betekenisvol nagebootst kan worden in cel/weefselkweek.

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

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

#### Doelstelling:

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

We richten ons specifiek op 5 doelgebieden:

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



mens veel ritmestoornissen ontstaan.

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

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

De modificaties die we willen bestuderen worden gemaakt op basis van humaan genetische studies, zoals GWAS, waarin varianten en mutaties gevonden zijn die hartfunctie en ontwikkeling beïnvloeden/verstoren. We zullen beginnen met de belangrijkste varianten en mutaties die afwijkingen veroorzaken uit de literatuur, **Uz en** netwerk of onze **Uz en** genetische studies. Specifiek zijn dit een gebied rond **10.1 c en 10.2 g**

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

#### **Haalbaarheid:**

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

### **3.3 Belang**

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

Maatschappelijk belang:

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

Wetenschappelijk belang:

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



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

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

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

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

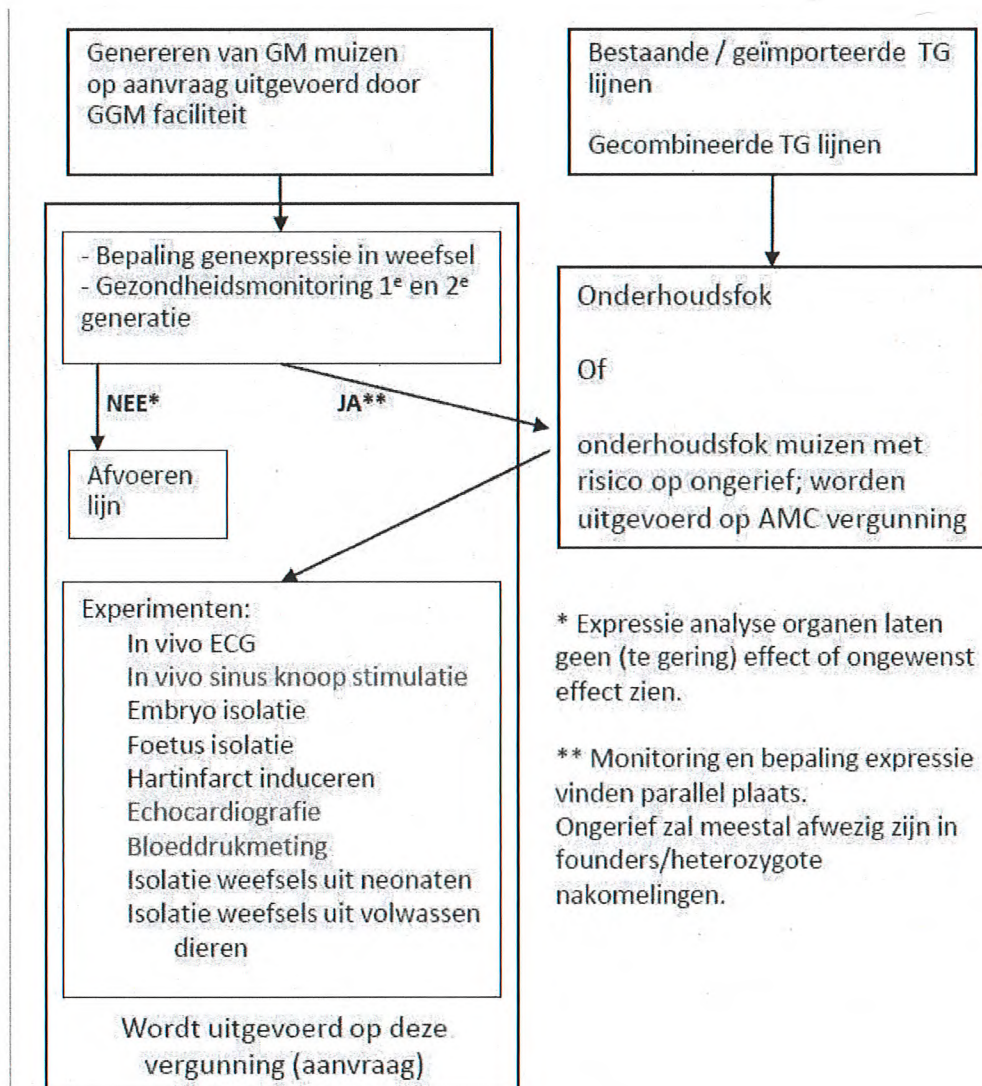
De onderzoekstrategie wordt weergegeven in figuur 1.

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

Voorts zullen we door middel van genome editing (CRISPR/Cas9) een gewenste verandering in het genoom van de muis aanbrengen. Dit kunnen modificaties zijn waarbij een gen wordt geïnactiveerd, een DNA sequentie wordt verwijderd, wordt vervangen door een variant, maar ook het invoegen van een fluorescente marker in genen/regio's van interesse om activiteiten van regulatoire elementen te kunnen waarnemen of specifieke weefsels of condities te markeren. Het genereren van transgene lijnen wordt uitgevoerd door de [REDACTED] van het [REDACTED] te [REDACTED]. Voor de injecties is een vergunning. Muizenlijnen met reeds vervaardigde bruikbare modificaties zullen geïmporteerd worden.

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





Figuur 1.

Onder deze vergunning wordt de gezondheid van de muizen van de 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> generatie fok van de gegenereerde lijn gemonitord om vast te stellen of de genetische modificatie ongerief voor de muizen oplevert. Hierbij zullen de kruisingen van heterozygoot met aangeschafte wildtype muizen en niet met wildtype littermates worden uitgevoerd, om eventuele "off target" effecten uit te sluiten. Als er geen ongerief wordt vastgesteld, wordt de lijn verder gefokt. Als er wel ongerief wordt vastgesteld dan zal de lijn verder gefokt worden op de generieke AMC vergunning voor fokken met risico op ongerief. Lijnen die worden geïmporteerd of worden gecombineerd van bestaande lijnen gaan direct naar onderhoudsfok.

Voor nieuw-gegenereerde lijnen geldt dat ze al worden onderzocht als heterozygoot gedurende de gezondheidsmonitoring (dus 1 gemodificeerd allel, 1 wildtype allel). Weefsels worden geïsoleerd waarna genexpressieniveaus en expressiepatronen worden bepaald van een panel van voor die modificatie specifieke genen. Als geen verandering in genexpressie aanwezig is, zal de lijn getermineerd worden. Als genexpressie wel is veranderd dan zullen vervollexperimenten gedaan worden die afhangen van het verwachte effect van de aangebrachte genetische modificatie en de uitslag van het initiële onderzoek. Op dit punt zal besloten worden met welke lijnen per type modificatie wordt doorgedaan. De keuze hangt af van de aangebrachte verandering nauwkeurigheid van de manipulatie (of er een groot of klein stuk van het gen van interesse is gemanipuleerd) en de mate van verandering van genexpressie.



De experimentele opzet zorgt voor een minimum aan ongerief; De lijnen worden gekruist om homozygote nakomelingen te genereren (fokprotocol ARIA). Bij de dieren wordt eerst een ECG met of zonder sinusknop stimulatie en/of echo en/of en/of bloeddrukmeting afgenomen en vervolgens worden ze zonder verdere experimentele handelingen gedood en de organen geïsoleerd voor histologische, structurele, genomische en elektrofysiologische bepalingen. Daarnaast zullen controle, heterozygote en homozygote embryo's en foeten worden geïsoleerd (zie Figuur 2) voor histologische, structurele, genomische en elektrofysiologische bepalingen. De uitkomst van deze screening laat het effect van het gemodificeerde regulatoire DNA of gen zien, en geeft inzicht in de rol van de variant/het gen in hartontwikkeling en ritmestoornissen. In deze lijnen wordt vervolgens in volwassen dieren een hartinfarct geïnduceerd en het regeneratie proces (response van het hart en vorming infarct) op verschillende tijdpunten, maar tot maximaal 3 maanden; na de ingreep bestudeerd. Tevens wordt er een controle groep gemaakt waarin de operatie voor het hartinfarct wordt uitgevoerd maar het daadwerkelijk hartinfarct niet wordt niet-veroorzaakt; zogenaamde Sham dieren. Om de regeneratieve respons te onderzoeken zullen *in vivo* ECGs worden afgenomen, en/of echocardiografisch onderzoek (echo) worden gedaan en/of de bloeddruk worden gemeten. De organen worden aan het einde van de proef geïsoleerd en zowel morfologische als moleculair biologische geanalyseerd voor diepgaandere onderzoek van de regeneratieve respons.

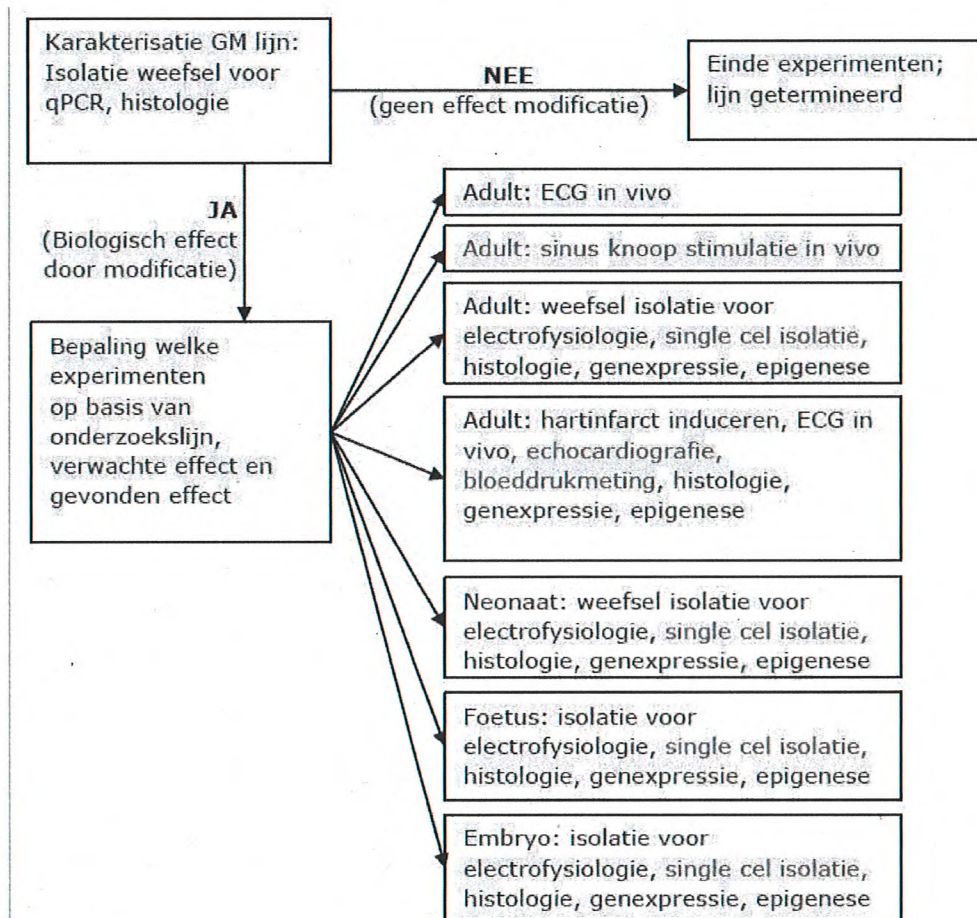
#### 3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

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

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

In transgene lijnen waar een effect op genexpressie is aangetoond, zullen vervollexperimenten worden gedaan die afhangen van 1) de verwachting van het effect van de modificatie op hartontwikkeling en prikkelgeleiding, en 2) het gevonden effect op genexpressie. Dit houdt in dat niet alle experimenten met alle verschillende lijnen worden uitgevoerd, maar dat dit sterk afhankelijk is van de aangebrachte ~~gemaakte~~ genetische modificatie en in ~~bij~~ welk component van het hart (geleiding, ontwikkeling, hartfalen ect.) het gen een rol speelt.





Figuur 2

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

Bij een verwachte rol van modificaties in boezemfibrilleren zullen *in vivo* ECGs worden afgenomen, en/of echocardiografisch onderzoek (echo) worden gedaan en/of de bloeddruk worden gemeten van wildtype, hetero- en homozygote dieren. Daarnaast zal weefsel geïsoleerd worden van volwassenen en neonaten voor *ex vivo* ECG, optical mapping, patch clamp experimenten, genexpressiebepaling (RNA-seq) en epigenetische parameters (ATAC-seq, ChIP-seq, 4C-seq).

Bij een verwacht effect van modificaties op de elektrofysiologische functie van de kamers zullen *in vivo* ECGs worden afgenomen op hetero- en homozygote dieren. Daarnaast zal weefsel geïsoleerd worden van volwassenen en neonaten voor *ex vivo* ECG, optical mapping, patch clamp experimenten, genexpressiebepaling (RNA-seq) en epigenetische parameters (ATAC-seq, ChIP-seq, 4C-seq).

Bij een verwacht effect op hartontwikkeling zal er zowel op embryonaal, foetaal, neonataal als adult niveau gekeken worden naar het effect van de modificatie. Weefsels worden geïsoleerd van dieren na geboorte zonder voorafgaande handeling voor morfologische/histologische etc. analyses, en bepalingen van epigenetische parameters (ATAC-seq, ChIP-seq, 4C-seq). Vrouwtjes worden zwanger gemaakt en



heterozygote en homozygote embryo's en foeten worden geïsoleerd en gedood, en onderzocht als beschreven voor de weefsels van volwassen dieren.

Bij een verwacht effect op het ziekteverloop zal in volwassen wildtype, heterozygote en homozygote dieren chirurgische een hartinfarct worden geïnduceerd. Op verschillende tijden na de inductie wordt een in vivo ECG gemaakt en weefsels geïsoleerd. Het weefsel wordt gebruikt voor morfologische/histologische analyses, en bepalingen van epigenetische parameters (ATAC-seq, ChIP-seq, 4C-seq). De varianten of mutaties gevonden bij mensen met de ritmestoornissen, hartdefecten en ziekteverloop vertonen overlap. Om de aspecten van de complexe genetische basis van hartafwijkingen, ritmestoornissen en ziekteverloop te modelleren zullen lijnen met verschillende modificaties onderling gekruist worden om de combinatie van genetische modificaties te kunnen analyseren. Van deze samengestelde lijnen wordt opnieuw het ongerief ingeschat gedurende de eerste twee generaties, en bepaald wat de vervolggexperimenten zijn op basis van 1) de verwachting van het effect van de modificatie op hartontwikkeling, prikkelgeleiding, etc. en 2) het gevonden effect op genexpressie.

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

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

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

Interactie:

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

Mijlpalen:

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

Keuzemomenten zijn:

- Founders worden geïdentificeerd, overgeschreven op dit protocol en gekruist met een wildtype muis om een lijn te genereren.
- De lijn wordt onderzocht (heterozygote dieren van de 1e en 2e generatie) en gezondheid gemonitord voor besluit fok zonder of met risico op ongerief.
- Op basis van de aangebrachte modificatie wordt van een set kandidaat-genen bepaald of de expressie is veranderd. Als genexpressie is veranderd, wordt de lijn aangehouden, zo niet dan wordt de lijn getermineerd (Figuur 1).
- Op basis van de resultaten van de experimenten zal besloten of, en welke, vervolggexperimenten nodig zijn.
- Als het ECG een verandering laat zien als gevolg van modificatie, wordt de lijn verder



elektrofysiologisch en moleculair onderzocht. Als het ECG geen verandering laat zien maar expressie van genen met een verwachte rol in functie aangedaan is zal de lijn verder onderzocht worden.

- Als een structurele afwijking wordt gevonden in het hart (of ander orgaan) zal de ontwikkeling worden onderzocht en de moleculaire mechanismen.

- Als de expressie is aangedaan van genen met een verwachte rol in regulatie van genexpressie, van groei, van ontwikkeling, zal het effect van de modificatie op regeneratie onderzocht worden.

- Als de lijn op basis van overleving na MI veranderingen laat zien als gevolg van modificatie, zal deze met behulp van echocardiografie en/of bloeddrukmeting verder onderzocht worden.

- Sinus knoop stimulatie wordt alleen uitgevoerd bij muizenlijnen welke door mutatie ontvankelijk voor AF.

- Een combinatie van bovenstaande effecten zal leiden tot analyse van functie, structuur, ontwikkeling en regeneratie.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	ECG, MI, Echocardiografie, sinus knoop stimulatie, bloeddrukmeting, isolatie van weefsel uit neonaten en adulten
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format DEC-advies

---

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

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

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project                      Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart
3. Titel van de NTS                              Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC
  - telefoonnummer contactpersoon
  - e-mailadres contactpersoon
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken                      27 juli 2017/24 januari 2019
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

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

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



8. Eventueel horen van aanvrager

n.v.t.

- Datum
- Plaats
- Aantal aanwezige DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager
- Gestelde vraag / vragen
- Verstrek(e) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum
- Gestelde vraag/vragen

24 januari 2019

De antwoorden zijn voor de leesbaarheid direct onder de vragen geplaatst.

-is het project nog steeds haalbaar zoals in versie 1 werd uitgelegd? Is er voldoende mankracht om al die operaties (n=8000 voor 5 jaar) te doen?

*8000 is inderdaad aan de hoge kant, we hebben de aantallen naar beneden bijgesteld en een go/no go moment ingebouwd. We verwachten dat dit haalbaar is.*

-dit is een maximale schatting voor het aantal dieren. Wat is een meer realistische schatting? Hoeveel dieren zijn er daadwerkelijk gebruikt tijdens het eerste gedeelte van de vergunning?

*Bij de aantallen voor het maken van MI hebben we ook een berekening gegeven voor een beknopte analyse, wat inhoudt dat er naar minder tijdstippen wordt gekeken. Dit komt ook overeen met de verbruikte aantallen van afgelopen jaar. Wat betreft de andere experimenten zijn de nieuw aangevraagde berekeningen juist gebaseerd op het gebruik van afgelopen jaar.*

-houdt u er rekening mee dat de gehele vergunning maar 5 jaar loopt. Heeft u wel voldoende tijd om al deze muizen te kunnen gebruiken?

*Zie vorig punt*

-graag uw visie op het feit dat er nu toch ook voor de CRISPR-cas9 aanpak extra lijnen gemaakt moeten worden vanwege mogelijke off target effecten. Dit laat het gebruik van het aantal proefdieren enorm toenemen terwijl deze methode juist het aantal dieren dat gebruikt zou worden voor het genereren voor een transgene lijn drastisch zou verminderen (naast de tijdsbesparing). Vindt u deze methode nog steeds zo geschikt of is de oude methode toch niet zo slecht?

*Het feit dat er meerdere lijnen per mutatie wordt aangehouden zorgt in eerste instantie bij de karakterisatie van de lijn wel voor wat meer gebruik van muizen. Maar juist omdat het genereren van de lijnen zoveel sneller de gewenste mutatie geeft, levert dit alsnog een vermindering op ten opzichte van de oude methode, waarbij er, zeker bij complexe kruisingen, veel muizen nodig waren om uiteindelijk genoeg muizen met het correcte genotype te verkrijgen.*

-wat gebeurt er met de verschillende lijnen? Hoe lang worden ze gevolgd, wanneer worden ze afgestoten (welke criteria worden gehanteerd voor off-target effecten), wanneer worden ze gebruikt voor de MI experimenten? Hoe voorkomt u dat lijnen met off-target effecten toch gebruikt worden voor deze experimenten met matig ongerief, als later blijkt dat ze niet bruikbaar zijn vanwege off-target effecten?

*Na de eerste karakterisatie wordt er een keuze gemaakt welke lijnen verder geanalyseerd gaan worden. Dit is een "go/no go" punt. Dit is wat verder verduidelijkt in het projectvoorstel.*

*Wanneer lijnen gebruikt worden voor MI hangt af van welk gen gemanipuleerd is. Het is dus zeker niet zo dat met iedere lijn MI experimenten worden gedaan. Ook dit is extra verduidelijkt in het projectvoorstel.*

*We verwachten dat off-target effecten bij de eerste 2 generaties fok naar boven zullen komen. Deze muizen wordt nooit gebruikt voor MI experimenten, aangezien in dit stadium de lijn gekarakteriseerd wordt.*

-in de bijlage bij B, bij punt 6 geeft u aan i.p.v. 5 lijnen nu 20 lijnen te willen onderzoeken met een MI experiment. Waarom is hier geen go/no go punt opgenomen waarbij eerst vastgesteld wordt dat er geen off-target effecten zijn in de betreffende lijn? Dit lijkt er wel te zijn in de figuur. Maar vooral het



aantal dieren dat een MI operatie gaat ondergaan neemt fors toe (1500 naar 8000). Deze toename is niet helemaal duidelijk te volgen. Kunt u deze berekening beter toelichten?

*Zie punt 2. Er is voorafgaand aan het starten van de MI experimenten (en alle andere experimenten) wel degelijk een "go/no go" punt ingebouwd. Dit is nu verduidelijkt in de projectaanvraag.*

-in de brief aan de CCD geeft u aan wildtype muizen als controle te willen gebruiken omdat niet-transgene littermates niet helemaal voldoen. In het voorstel lijkt het dat u beide controles wil meenemen. Klopt de aanname dat u beide controles wil gebruiken? Zo ja, kunt u uitleggen waarom u dan toch ook de niet-transgene littermates wil gebruiken als controle, ondanks dat ze blijkbaar niet (geheel) voldoen?

*Zoals verderop in het document gaat het om 10 heterozyote, 10 homozygote en 10 wildtype muizen. Per studie zal er 1 controle groep gebruikt worden en zal er bekeken worden of dit niet-transgene littermates of wildtype muizen zullen zijn. Ook zag ik nu dat berekening verderop in dit punt niet klopte, deze is nu aangepast.*

-U geeft aan dat het aantal daadwerkelijk gebruikte muizen afhankelijk is van het aantal geschikte tijdstippen voor de betreffende lijn. Deze zullen niet allemaal onderzocht worden. Bedoelt u hiermee de verschillende levensstadia (embryo/foetus/neonaat/volwassen dier)? Waar hangt de keuze om verschillende levensstadia te onderzoeken vanaf? (bijv. uit literatuur/eigen ervaring effect op ontwikkeling, homeostase, etc?)

*We bedoelen hiermee dat het per lijn en dus per verschillend gen van interesse afhankelijk is, welke tijdstippen van interesse zijn. Dit valt dus samen met wanneer tijdens ontwikkeling of na interventie het gen tot expressie komt. Deze keuze is zowel gebaseerd op literatuur en databases als op onze eigen ervaring.*

- Datum antwoord 25 januari 2019
- Verstrek(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag  
*De aangepaste documenten (projectvoorstel, bijlage en NTS) zijn bijgevoegd.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

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

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*

*>ja*

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~een wijziging op een bestaande vergunning.~~

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

*>ja*

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.



>nec

## C. Beoordeling (inhoud)

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

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

De aanvragers richten zich op 5 verschillende gebieden:

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

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

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

>nvt

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

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

### *Belangen en waarden*

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

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



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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project, zijn de proefdieren, de onderzoekers en in mindere mate patiënten met (aangeboren of verkregen) hart- en vaatziekten. Een deel van de muizen wordt door dit onderzoek geschaad omdat ze pijn en stress ondergaan door een operatie, het individueel huisvesten tijdens de herstelperiode of het ondergaan van een herhaalde ECG/echo/bloeddruk-meting onder verdoving. Het Een grootste gedeelte (5100/14525) wordt gedood zonder voorafgaande behandeling. De onderzoekers zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op hun nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op lange termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling van aangeboren en verkregen hartziekten.

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

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

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

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

De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met de beschreven technieken.

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

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



*Welzijn dieren*

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

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

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

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

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

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

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

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

De "heelheid" van het dier wordt aangetast doordat er genetische modificaties plaatsvinden. Er wordt niet verwacht dat hierdoor sprake zal zijn van vermindering of



ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Na het induceren van het hartinfarct kan het dier wel stress en pijn ondervinden waardoor het natuurlijk gedrag verstoord wordt.

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

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

3V's

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

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

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

Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van statistische methoden en met waarden uit eerdere proeven. Er is een voorlopige power berekening gedaan om de aantallen te schatten voor de verschillende uitkomstparameters. De ECGs en de karakterisatie van het hart worden in dezelfde dieren verricht. Naast de vermindering van proefdieren, is er ook sprake van verfijning (in de zin van de meest geschikte methode) omdat uitkomstparameters geanalyseerd kunnen worden op associaties. De aanvragers hebben een wijziging ingediend om deze schatting van het aantal dieren bij te stellen. De CRISPR-Cas9 genmutatie bleek niet één lijn maar meerdere lijnen op te leveren. Deze verschillende lijnen worden allen geanalyseerd voor het hebben van de gewenste mutatie maar ook voor het niet hebben van "off target" mutaties. Daarnaast bleek ook dat niet-transgene nestgenoten niet altijd de beste controle bleken te zijn, omdat deze ook genetische afwijkingen kunnen hebben ten opzichte van wildtype muizen. Soms zijn daarom ook wildtype muizen nodig als controle. Deze gewaarwordingen tijdens het uitvoeren van de studies hebben geleid tot het bijstellen van het aantal benodigde aantal dieren. De DEC vindt dat de aanvrager voldoende heeft gemotiveerd waarom de schatting van het aantal te gebruiken dieren verhoogd is.



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

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

- 1) de muis een goed model is voor de vorming van het hart en de regulatie van het ritme in de mens en de onderzoeksgroep geavanceerde apparatuur tot zijn beschikking heeft om de ECG zo goed mogelijk te kunnen verrichten;
- 2) de rattenmoeders alleen gedood worden voor de isolatie van embryo's of foeten na controle (echo) op drachtigheid en niet alleen op basis van een aanname van drachtigheid;
- 3) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven zo optimaal uit te voeren.
- 4) er gebruik gemaakt wordt van pijnstilling tijdens en na de operatie.
- 5) er een go/no go beslissing is gedefinieerd die voorkomt dat dieren met een off-target mutatie een MI operatie ondergaan terwijl de resultaten hiervan niet goed te interpreteren zouden zijn. Deze dieren wordt onnodig matig ongerief bespaard. Daarnaast borgen de HEPs (symptomen van onwelzijn of ontwikkelen van acuut hartfalen) dat de dieren beschermd zullen worden tegen het ondergaan van onverwacht of ernstiger ongerief dan ingeschat is in deze aanvraag.

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

nvt

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

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

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

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

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

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

nvt



NTS

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

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

## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*): *Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol die genetische elementen spelen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart, het gebruik van maximaal 14525 muizen en het lichte (10275/14525=69.4%) tot matige (4450/14525=30.6%) ongerief dat deze muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?*

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

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

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met een aangeboren of verkregen hartaandoening. Deze kennis zou op langere termijn kunnen bijdragen aan een betere diagnose van en/of een betere therapie voor deze hartaandoeningen.

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

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

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

Hoewel maximaal 14525 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan een groot gedeelte zonder voorafgaande behandeling gedood zullen worden (n=8225), een gedeelte van de muizen matig ongerief zullen ondergaan doordat ze een hartinfarct operatie (n=4000) of een ECG en andere analyses tijdens hun leven (n=450) zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de rol van genetische elementen in de



ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart en in de onderliggende mechanismen. De verwachting is dat de inzichten uit dit onderzoek bij kunnen dragen aan een betere diagnose of behandeling van hartaandoeningen. De toepassing van deze inzichten in de kliniek zal echter nog jaren op zich laten wachten en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over de rol van genetische elementen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het licht tot matige ongerief en het gebruik van maximaal 14525 muizen opweegt.

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

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

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de rol die genetische elementen spelen in de ontwikkeling, regeneratie (na een hartaanval) en de functie van het hart, het gebruik van maximaal 14525 muizen en het lichte (n=10275) tot matige ongerief (n=4000 hartinfarct en n=450 voor herhaalde ECG en andere analyses) dat ze zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. Het grootste gedeelte van de muizen zullen gedood worden zonder voorafgaande behandeling (naast het genetisch manipuleren). Een gedeelte van de muizen (maximaal 4000) zullen een hartinfarct operatie ondergaan. Analyses met betrekking tot de elektrofysiologie, functionele/structurele/moleculaire karakterisatie, prenatale ontwikkeling en de regeneratie na hartinfarct zullen gebruikt worden om deze doelstellingen te behalen. De aanvrager heeft goed onderbouwd dat er geen proefdiervrij alternatief is voor het beantwoorden van de gestelde vraagstellingen. Het onderzoeken van genetische elementen in de ontwikkeling van het hart en de regulatie van het ritme kunnen niet in een proefdiervrij alternatief bestudeerd worden omdat het een zeer complexe interactie van verschillende celtypes betreft. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar. Het Go/No Go moment betreft vooral de selectie van de genetisch gemodificeerde lijn om de verschillende analyses in te verrichten. De lijn moet de juiste genexpressie hebben. In de wijziging lichten de aanvragers toe dat er verschillende lijnen ontstaan uit de CRISPR-Cas9 methode in plaats van een enkele lijn zoals eerder verwacht. Deze verschillende lijnen worden 2 generaties gevolgd om te controleren op het ontstaan van ongerief maar ook om te analyseren of er geen "off-target" effecten zijn in niet-gewenste genen. Daarnaast worden voor de kruisingen wildtypes gekocht in plaats van verder te fokken met niet-transgene nestgenoten. Beide aspecten leiden tot een grote toename van het aantal proefdieren. Deze dieren worden zonder behandeling gedood waardoor het ongerief beperkt blijft. Na deze analyse wordt besloten of de betreffende lijn verder onderzocht zal worden. Het gevolg hiervan is dat meer lijnen in aanmerking komen voor een operatie om een hartinfarct te veroorzaken, leidend tot matig ongerief. Echter niet in alle lijnen zal onderzoek gedaan worden naar regeneratie na een hartinfarct. Deze keus wordt gemaakt op basis van de functie van het gen en het verschil in genexpressie door de mutatie. Afhankelijk van het verwachte effect van het gemodificeerde gen worden



daarna de passende analyses verricht. De genetisch gemodificeerde muizen waarin een ECG verricht wordt zullen ook gebruikt worden voor een functionele/structurele/moleculaire karakterisatie. Dit geeft de mogelijkheid om de associatie tussen verschillende uitkomstparameters te onderzoeken en draagt bij aan zowel verfijning van de strategie als vermindering van proefdieren. De DEC heeft in de afweging meegenomen dat naast de 14525 proefdieren in deze aanvraag, deze onderzoeksstrategie waarbij genetisch gemanipuleerde muizenlijnen gegenereerd zullen worden, een aanzienlijk aantal surplus muizen zal opleveren (muizen met een ongeschikte genexpressie). Deze dieren worden niet als proefdier gerekend maar zijn wel meegewogen in het beantwoorden van de centrale morele vraag.

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

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. In de wijziging heeft de aanvrager voldoende toegelicht dat er in sommige gevallen wildtype muizen als controle gebruikt moeten worden om "off-target" effecten uit te kunnen sluiten. Ten opzichte van de originele aanvraag zal de aanvrager in controle muizen van de MI operatie experimenten, ook een operatie verrichten maar zonder een infarct te veroorzaken. De DEC beoordeelt deze controle, wetenschappelijk gezien, als een betere controle dan muizen die geen operatie ondergaan zoals beschreven stond in de originele aanvraag. Daarnaast bleken er een aantal additionele analyses nodig te zijn om een beter beeld te krijgen van het effect van een gen op het functioneren van het hart. Deze additionele analyses sluiten goed aan bij het beantwoorden van de onderzoeksvraag. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door groepsgrootte berekeningen te verrichten met data verkregen uit eerdere experimenten. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

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

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

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



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

Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

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



## **Bijlage I: Voorbeelden**

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

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

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

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

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

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

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

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



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

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

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

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

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

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

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

## **D. Ethische afweging**

- D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:

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

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.

Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel

De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep