

- Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes¹**
- Anzeige von Tierversuchen an Wirbeltieren, Kopffüßern oder Zehnfußkrebsen**

Von der Genehmigungsbehörde auszufüllen!

Geschäftszeichen

Antragsteller:
Prof. Dr. med. Wolfgang M. Kübler

Telefon: 030-450-528-501	Telefax: 030-450-529-920	E-Mail: wolfgang.kuebler@charite.de
-----------------------------	-----------------------------	--

Verantwortliche Leiterin/verantwortlicher Leiter des Vorhabens:

Prof. Dr. med Wolfgang M. Kübler

Dienstliche Anschrift (Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Institut für Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin , CCM, CCO, Virchowweg 6, 10117, Berlin

Telefon: 030-450-528-501	Telefax: 030-450-529-920	E-Mail: wolfgang.kuebler@charite.de
-----------------------------	-----------------------------	--

Stellvertretende Leiterin/stellvertretender Leiter des Vorhabens:

Dr. Jana Grune

Dienstliche Anschrift (Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Institut für Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin , CCM, CCO, Virchowweg 6, 10117, Berlin

Telefon: 030-450-528-574	Telefax: 030-450-529-920	E-Mail: jana.grune@charite.de
-----------------------------	-----------------------------	----------------------------------

Anlagen:

Projektzusammenfassung (§ 31 Abs. 2 i. V. m. § 41 Abs. 1 TierSchVersV; nicht erforderlich bei Anzeigen; die Zusammenfassung ist mit dem Formular des BfR außerdem in elektronischer Form vorzulegen

1. http://www.bfr.bund.de/de/nichttechnische_projektzusammenfassung_fuer_tierversuchsvorhaben-187738.html;
2. Glossar der im Text verwendeten Abkürzungen und ggf. spezifischen Fachausdrücke
3. Liste der Literaturzitate (falls nicht im Text eingearbeitet) (s. Punkt 1.1.2)
4. ggf. Formblatt „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ (s. Punkt 1.1.5.1)
5. ggf. Formblatt „Wiederholte Verwendung von Primaten“
6. Belastungstabelle (s. Punkt 1.2.9)
7. Score Sheet (s. Punkt 1.2.10)
8. Aufzeichnungsmuster nach § 9 Abs. 5 TierSchG (s. Punkt 1.2.11)
9. ggf. Personenbögen
10. ggf. Formblätter „Angaben zur Biometrischen Planung“
11. Statistisches Gutachten vorhanden nicht vorhanden
12. Sonstige:

¹ Alle Paragraphenangaben beziehen sich auf das Tierschutzgesetz (TierSchG) bzw. die Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) in der jeweils geltenden Fassung

1. Angaben zum Versuchsvorhaben

Bezeichnung des Versuchsvorhabens **A)**

Mechanismen des vaskulären Remodelings bei pulmonaler Hypertonie infolge von Herzinsuffizienz

Kurzbezeichnung:

Vaskuläres Remodeling bei pulmonaler Hypertonie Typ 2

Im Falle von Anzeigen: Rechtsgrundlage des Anzeigeverfahrens

- § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 TierSchG Organ-/Gewebsentnahme zu anderen als wissenschaftlichen Zwecken
- Nicht genehmigungspflichtige Tierversuche – in Verbindung mit:
 - § 8a Abs. 1 Nr. 1 TierSchG; gesetzlich vorgeschrieben
 - § 8a Abs. 1 Nr. 2 TierSchG; diagnostische Maßnahmen /Chargenprüfungen etc.
 - § 8a Abs. 3 TierSchG Versuche an Zehnfußkrebsen
- § 8a Abs. 1 Nr. 3a TierSchG; Eingriffe und Behandlungen zur Gewinnung/Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen
- § 8a Abs. 1 Nr. 3b TierSchG; Organ-/Gewebsentnahme zu wissenschaftlichen /diagnostischen Zwecken
- § 8a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG; Eingriffe und Behandlungen zur Aus- Fort und Weiterbildung

Im Falle von § 8a Abs. 1 Nr. 1 TierSchG: Rechtsgrundlage der Genehmigungsfreiheit:

1.1 Angaben zum wissenschaftlichen Hintergrund

1.1.1 Angabe des Zwecks des Versuchsvorhabens und wissenschaftlich begründete Darlegung, dass dieser einem in § 7a Abs. 1 TierSchG genannten Zwecke zuzuordnen ist.

Die Untersuchungen sind unerlässlich zum / zur:

- Grundlagenforschung
- Vorbeugen, Erkennen oder Behandeln von Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder körperlichen Beschwerden
- Erkennen oder Beeinflussen physiologischer Zustände oder Funktionen bei Mensch und Tier.
- Förderung des Wohlergehens von Tieren oder Verbesserung der Haltungsbedingungen von Landwirtschaftlichen Nutztieren
- Erkennung von Umweltgefährdungen
- Entwicklung und Herstellung sowie Prüfung von Arzneimitteln, Lebensmitteln, Futtermitteln oder anderen Stoffen oder Produkten
- Prüfung von Stoffen oder Produkten auf ihre Wirksamkeit gegen Schädlinge
- Artenschutz
- Aus-, Fort- oder Weiterbildung
- Gerichtsmedizinische Untersuchungen

Erläuterungen:

Das in diesem Antrag beschriebene Versuchsvorhaben dient der Identifizierung neuer Mechanismen und Signalwege bei der Pathophysiologie des pulmonal-vaskulären Gefäßumbaus („vaskuläres Remodeling“) bei der pulmonalen Hypertonie (PH). Dabei soll vordergründig die pulmonale Hypertonie Typ 2 (Entstehung infolge von Linksherzerkrankungen) untersucht werden. Des Weiteren sollen neuartige Behandlungsstrategien in Form von pharmakologischen Inhibitoren für diese größte Gruppe der PH-Erkrankungen getestet werden, um das vaskuläre Remodeling einzudämmen. Für diese Erkrankung existiert bislang keinerlei etablierte und/oder zugelassene pharmakologische

Therapie.

In voraus gegangenen Experimenten, konnten wir und andere Arbeitsgruppen zeigen, dass verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren wie SMAD3, TAZ, MRTF und RUNX2 auf molekularer Ebene an der Regulation des vaskulären Remodelings während der PH beteiligt sind (Hoffmann et al., 2011; Ruffenach, Chabot et al., 2016; Zabini et al., 2017). Weiterhin ist bekannt, dass die vermehrte Aktivierung der genannten Signalkaskaden während der PH zur vermehrten Zellproliferation, zur Migration von Mastzellen, zur Akkumulation von Extrazellulärmatrix, zur Hypertrophie von Muskelzellen der Pulmonalarterie und letztlich zur Zelltransformation durch vaskuläre Calcifizierung führt. Die Gesamtheit dieser Prozesse resultiert letztlich in der „Versteifung“ („vaskuläres Stiffening“) der Gefäßwände und verursacht beim Patienten eine reduzierte Leistungsfähigkeit und verschlechtert bereits bestehende Symptome der Linksherzerkrankung. Eine manifeste PH der Klasse 2 führt bei schwerem Verlauf oftmals nach Jahren zum Tod des Patienten durch Rechtsherzversagen.

Die Ziele des vorliegenden Tierversuchsvorhabens sind deshalb:

1. Die molekularen Mechanismen des vaskulären Remodelings zeitlich und kausal zu erfassen, um die gewonnenen Erkenntnisse gezielt auf pharmakologisch-therapeutische Ansätze anwenden zu können (**Teilversuch A**).
2. Herauszufinden, inwieweit die molekularen und folglich auch pathophysiologischen Veränderungen des vaskulären Remodelings reversibel bzw. umkehrbar sind (**Teilversuch B**)
3. Die pharmakologischen Inhibitoren Verteporfin (TAZ-Inhibitor), CCG-1423 (MRTF-Inhibitor) und den CADD522 (RUNX2-Inhibitor) auf ihre Tauglichkeit zur Behandlung des vaskulären Remodelings während der PH zu testen (**Teilversuche C-E**).

Die Ergebnisse dieser Studie sind die Basis für neue und gezielte Behandlungsansätze für diese Form der PH und können voraussichtlich zu einer erheblichen Reduktion der Mortalität und Morbidität bei Patienten mit PH infolge von Linksherzerkrankung beitragen.

1.1.2 Wissenschaftlich begründete Darlegung der Unerlässlichkeit des Versuchsvorhabens unter Berücksichtigung des jeweiligen Standes der wissenschaftlichen Erkenntnisse (§ 7a Abs. 2 Nr. 1 TierSchG i. V. m. § 31 TierSchVersV) B)

-bitte Anlage Projektzusammenfassung beifügen (§ 31 Abs. 2 TierSchVersV); nicht erforderlich bei Anzeigen -

Erläuterungen:

Im hier dargestellten Versuchsvorhaben „Mechanismen des vaskulären Remodelings bei pulmonaler Hypertonie infolge von Herzinsuffizienz“ sollen die dem vaskulären Remodeling zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, sowie deren zeitlicher und kausaler Zusammenhang mit der progredienten Entwicklung einer PH infolge von Linksherzerkrankung charakterisiert werden.

Die pulmonale Hypertonie umfasst eine heterogene Gruppe an Erkrankungen, die durch einen Anstieg des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks auf über 25 mmHg in Ruhe oder 30 mmHg bei Belastung charakterisiert sind. Die pulmonale Hypertonie manifestiert sich üblicherweise im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium und führt im Verlauf mehrerer Jahre in der Regel zum Tod durch Rechtsherzversagen.

Die klinische Klassifikation unterscheidet zwischen 5 Klassen der PH (Simonneau et al., 2013):

- 1) pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)
- 2) PH infolge von Linksherzerkrankung
- 3) PH durch Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
- 4) Chronisch thrombo-embolische PH
- 5) PH mit unklarer, multifaktorieller Ursache

Die erste Klasse der PH (PAH) ist die bislang am intensivsten beforschte Klasse der pulmonalen Hypertonie. Für die PAH stehen deshalb nach klinischer Erprobung und Zulassung eine Reihe pharmakologischer Therapie-Optionen, darunter Endothelinrezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-5-Hemmer oder synthetische Prostazyklin-Analoga, zur Verfügung. Im Gegensatz dazu sind die nicht-PAH Formen der PH (Klassen 2-5) bislang nur gering gradig charakterisiert und die ihnen zugrundeliegenden Mechanismen nur wenig erforscht. Therapeutische Ansätze fehlen laut den „Richtlinien zur Diagnose und Behandlung von Patienten mit pulmonaler Hypertonie“ der europäischen Gesellschaft für Kardiologie

bislang weitestgehend (Vachiéry et al., 2013; Galiè et al., 2015).

Zur Prävalenz der PH mit Linksherzerkrankung gibt es kaum zuverlässige Daten. 60-80% aller Patienten mit chronischem Linksherzversagen entwickeln eine sekundäre PH (Ghio et al., 2001; Lam et al., 2009). Eine retrospektive Analyse von Patienten mit PH zeigte, dass ca. 36 % der PH-Patienten ebenfalls an einer Linksherzerkrankung litten (Gerges et al., 2013). Die Linksherzinsuffizienz ist damit die häufigste Ursache der PH.

Die Entstehung der PH infolge von Linksherzerkrankungen wird hauptsächlich durch einen passiven Anstieg des pulmonal-vaskulären Drucks verursacht. Dieser erhöhte Druck entsteht durch den Rückstau von Blut vom linken Herzen in die Lungenstrombahn (Vachiéry et al., 2013; Galiè et al., 2015). Zusätzlich wird der pulmonal-vaskuläre Widerstand durch einen reaktiven Anstieg verstärkt, was die rechtsventrikuläre Nachlast erhöht (Lam et al., 2009; Cappola et al., 2002). Bei vielen Patienten können diese rein mechanischen Komponenten der venösen Stauung zusätzliche, überlagernde Komponenten, wie eine pulmonale Vasokonstriktion, eine verminderte NO-Verfügbarkeit, eine erhöhte Expression von Endothelin, eine Desensibilisierung gegenüber der Vasodilatation durch natriuretische Peptide und vaskuläres Remodeling, auslösen (Vachiéry et al., 2013; Fang et al., 2012; Moraes et al., 2000). All diese Komponenten führen in ihrer Gesamtheit zu einer weiteren Erhöhung des mittleren pulmonal arteriellen Drucks. In der Folge entstehen Erkrankungen der pulmonalen Gefäße, eine Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast und schließlich der Tod des Patienten durch Rechtsherzversagen (Vachiéry et al., 2013; Galiè et al., 2015).

Eines der wichtigsten Charakteristika der PH – unabhängig der Ätiologie – ist der pulmonal-vaskuläre Gefäßumbau („vaskuläres Remodeling“). Während der PH, sind vor allem die Gefäßwände der Pulmonalarterie einer erhöhten Schubspannung („shear stress“) ausgesetzt, was sich vordergründig in einer Verdickung der Gefäßwände mit reduziertem Gefäßdiameter zeigt. Dies führt zu einer Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes und folglich zu anhaltender PH (Jeffery & Morrell, 2002). Auf molekularer Ebene konnte in einem Rattenmodell zur PH (Klasse 2) gezeigt werden, dass Gene die für inflammatorische Prozesse (entzündliche Prozesse), Immunantworten und extrazelluläre Matrix-Regulation verantwortlich sind, verändert exprimiert werden (Hoffmann, Yin et al., 2011).

Weitere Studien postulieren für die PAH (Klasse 1), dass eine Fehlregulation des bone morphogenetic protein receptor 2 (BMP-II) in der Folge zu erhöhten transforming growth factor beta (TGF β) -Spiegeln führt, die wiederum downstream per SMAD2/3 das vaskuläre Remodeling begünstigen (Morrell, 2006, Oriols, Gomez-Puerto et al., 2017, Richter, Yeager et al., 2004, Zakrzewicz, Kouri et al., 2007). TGF- β vermittelt zusätzlich über den myocardin-related transcription factor (MRTF) eine robuste Expression des Hippo-Signalwegs über das Signalmolekül transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ), welches in der Vergangenheit für die Akkumulation und Deposition von extrazellulären Matrixproteinen in verschiedenen Zelltypen der Pulmonalarterie bekannt wurde (Bertero, Cottrill et al., 2015a, Bertero, Cottrill et al., 2015b). Ein weiterer Faktor, der die Versteifung der Pulmonalarterie begünstigt ist die während der PH einsetzende Calcifizierung als Folge einer Transdifferenzierung von Gefäßmuskelzellen durch den Transkriptionsfaktor Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (Ruffenach, Chabot et al., 2016). Realisiert wird dieser Prozess durch den osteogenen Transkriptionsfaktor RUNX2, der durch das TAZ-Molekül vermehrt exprimiert wird (Matsumoto, La Rose et al., 2016).

Basierend auf dem jetzigen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse, möchten wir im vorliegenden Versuchsvorhaben die folgenden Hypothesen untersuchen:

1. Ob und in welchem zeitlichen Rahmen die genannten Signalkaskaden (SMAD3, TAZ, MRTF, RUNX2) durch mechanische bzw. extrazelluläre Signale, wie Shear Stress oder erhöhte TGF- β -Spiegel, im Modell der PH (Klasse 2) induziert werden (**Teilversuch A**).
2. Ob die Induktion der genannten Signalkaskaden reversibel ist (**Teilversuch B**).
3. Ob die pharmakologische Inhibition der Signalmoleküle TAZ, MRTF und RUNX2 zu einer Verbesserung des kardiovaskulären Status während der PH (Klasse 2) führt (**Teilversuch C-E**).

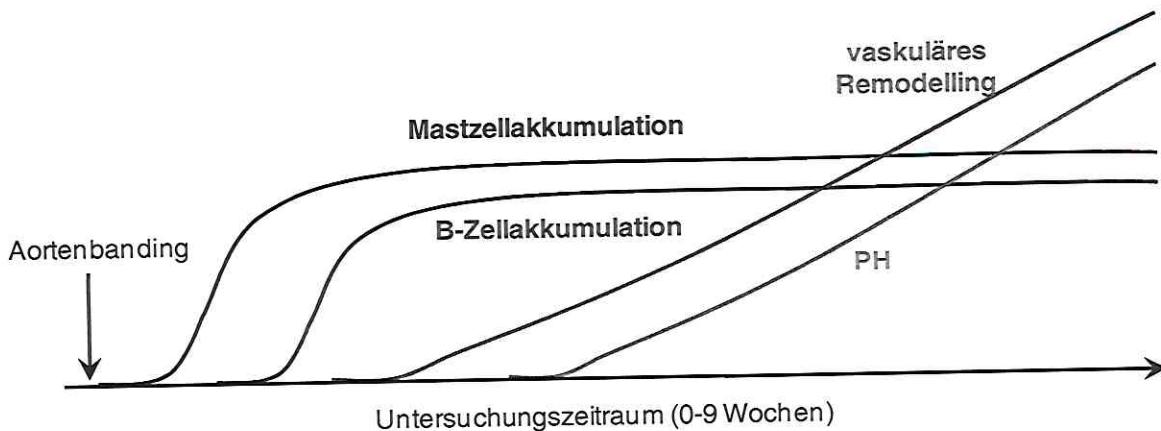


Abbildung 1: Postulierte zeitliches Profil der hämodynamischen und histologischen Veränderungen in der Lungenstrombahn nach Aortenbanding, das im vorliegenden Antrag untersucht werden soll. In Bestätigung der dargelegten Hypothesen wird erwartet, dass zunächst nach Aortenbanding Mastzellen die Lunge infiltrieren, gefolgt von einer (Mastzell-vermittelten) Akkumulation von B-Zellen (beides bereits durch Vordaten unserer Gruppe bestätigt), die dann ihrerseits das vaskuläre Remodeling induzieren, das letztendlich zur vollen Ausprägung einer PH führt.

Die Diskrepanz zwischen der hohen Inzidenz der PH infolge von Linksherzerkrankung und der absolute Mangel an klinisch zugelassenen pharmakologischen Behandlungsstrategien veranschaulicht Bedarf und Bedeutung, sowohl intensiver Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung der PH (Klasse 2) als auch der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien auf Basis dieser Ergebnisse. Die Überprüfung dieser Hypothesen ist für die Erlangung eines besseren Verständnisses der pathophysiologischen Vorgänge der PH infolge von Linksherzerkrankung und für die Entwicklung und Optimierung neuartiger Therapieansätze unerlässlich. Ihre Bearbeitung ist daher Ziel des hier vorgestellten Versuchsvorhabens.

Kurze Zusammenfassung der Zielsetzungen des Versuchsvorhabens:
 Es soll ein besseres Verständnis über Kausalität und zeitliche Abfolge der molekularen Veränderungen erlangt werden, die während der PH (Klasse 2) und des vaskulären Remodelings stattfinden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dann gezielt zur pharmakologischen Inhibition der identifizierten molekularen Signalmoleküle genutzt werden, um eine mögliche Behandlungsstrategie für die PH (Klasse 2) zu erarbeiten.

1.1.3 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass der Versuchszweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren (z. B. Zellkulturen, isolierte Organe etc.) als den Tierversuch erreicht werden kann (§ 7a Abs. 2 Nr. 2 TierSchG)

Erläuterungen:

Die Verwendung von Säugetieren zu Erforschung der genannten Fragenstellung, ist unbedingt notwendig, da die Entwicklung der PH (Klasse 2) ein multifaktorieller Prozess ist, der durch eine primäre Schädigung des Herzens verursacht wird und sekundär zu Gefäßschäden führt. An diesem Prozess sind wie oben dargestellt, neben Kardiomyozyten selbst, eine Reihe von Immunzellpopulationen sowie Gefäßmuskelzellen beteiligt. Das Tiermodell dient hierbei als präklinisches Versuchsvorhaben zur Weiterentwicklung einer möglichen Therapie-Option zur Behandlung der PH (Klasse 2).

Die Untersuchung des pathophysiologischen Mechanismus der PH (Klasse 2) sowie von möglichen vorteilhaften Effekten der pharmakologischen Inhibitoren, erfordert als Modell den Gesamtorganismus, da diese Vorgänge die Interaktion mehrerer Organsysteme voraussetzen. Vorteilhafte Effekte auf das Herz-Kreislauf-System lassen sich *in vitro* schlecht nachstellen und insbesondere immunologische Prozesse unterliegen einer komplexen Regulation, die eine Koordination zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben erforderlich macht. Derzeit sind keine Alternativmethoden bekannt, die einen Tierversuch zur Untersuchung von kardialer und vaskulärer Funktion im Modell der PH (Klasse 2) am Gesamtorganismus, ersetzen könnten. Die Untersuchung der kardialen und vaskulären Funktion ist daher nur in einem lebenden Organismus möglich. Die Ratte ist die sinnesphysiologisch am niedrigsten stehende Tierart an dem dieses

Vorhaben technisch möglich ist. Die Maus kommt als Tierart für das vorgeschlagene Tiermodell nicht in Frage, da in einer umfangreichen Studie für 36 Mausstämme gezeigt werden konnte, dass Mäuse im Vergleich zu Ratten nur ein moderates vaskuläres Remodeling ausprägen (Meng et al., 2016).

1.1.4 Ausschöpfung zugänglicher Informationsmöglichkeiten (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1b TierSchG)

1.1.4.1 Welche Informationsmöglichkeiten wurden genutzt C)?;

- bitte Anlage „Liste der Literaturzitate“ beifügen -

Schlüsselwörter:

Pulmonale Hypertonie (Klasse 2), vaskuläres Remodeling, vaskuläres Stiffening, suprakoronares Aortenbanding, Debanding, RUXN2, TAZ, MRTF

Erläuterungen (z. B. Art der Recherche, verwendete Datenbanken):

Die antragstellenden Personen besuchen regelmäßig relevante nationale und internationale Fachtagungen auf dem Gebiet der Pathogenese und Therapie von Herzinsuffizienz, pulmonaler Hypertonie und vaskulärer Erkrankungen. Die Antragsteller halten außerdem persönliche Kontakte zu anderen Wissenschaftlern dieser Wissenschaftsdisziplin, so dass Überschneidungen der geplanten Tierversuche oder Doppelversuche vermieden werden können.

Während der umfassenden Literaturrecherche im Rahmen der Antragstellung wurden die medizinische Datenbank "Medline" und der "Index Medicus" herangezogen. Die neuerscheinende Literatur zum Thema wird fortlaufend über die medizinische Datenbank "PubMed" verfolgt. Außerdem stehen den Antragstellern die Präsenzbibliotheken der Charité – Universitätsmedizin Berlin sowie der Zugang zu elektronischen Zeitschriften zur Verfügung.

Die Literaturrecherche findet in unserer Arbeitsgruppe seit vielen Jahren regelmäßig statt, so dass viele der zitierten Publikationen sehr gut und seit Jahren bekannt sind. Im Zuge der Antragsplanung und –vorbereitung wurde erneut eine intensive Literaturrecherche mit Hilfe der genannten Datenbanken im Zeitraum November/Dezember 2017 durchgeführt. Im Zuge dessen konnten leider keine geeigneten Alternativ- oder Ersatzmethoden im Sinne des 3R-Prinzips ausfindig gemacht werden. Einzelheiten zur Historie der Literaturrecherche können sie dem beigelegten Merkblatt zur „Ausschöpfung zugänglicher Informationsmöglichkeiten“ entnehmen.

Zeitpunkt der Recherche:
regelmäßig

1.1.4.2 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass das angestrebte Versuchsergebnis noch nicht hinreichend bekannt ist

Erläuterungen:

Nach unserem besten Wissen gibt es bis heute noch keine Literatur, die auf Grundlage dieser Erkenntnisse die gleiche oder eine ähnliche Fragestellung diskutiert. Alle oben genannten postulierten molekularen Mechanismen, die möglicherweise an der Pathophysiologie der PH (Klasse 2) beteiligt sein könnten, wurden bislang nur für die PAH (Klasse 1) untersucht. Die PAH folgt einer völlig anderen Pathologie als die PH (Klasse 2), so dass die aus diesen Studien gewonnen Erkenntnisse bislang nur hypothetisch auf die PH (Klasse 2) übertragen werden konnten. Bis heute fehlen grundlegende Kenntnisse zu molekularen und funktionellen Mechanismen des vaskulären Remodelings.

Des Weiteren gibt es bis heute keinerlei Erkenntnisse darüber, ob die Induktion dieser Signalwege während der PH (Klasse 2) reversibel ist bzw. durch pharmakologische Inhibitoren verhindert werden kann. Welche möglichen vorteilhaften Effekte eine pharmakologische Inhibition auf die kardiale und vaskuläre Funktion haben, wurde bislang noch nicht untersucht.

1.1.4.3 Handelt es sich um einen Doppel- oder Wiederholungsversuch D)? (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1b TierSchG)

Ja X Nein

Wenn ja, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die Überprüfung bereits bekannter Versuchsergebnisse durch das beantragte Versuchsvorhaben unerlässlich ist.

Erläuterungen:

Trifft nicht zu.

1.1.5 Art und Anzahl der vorgesehenen Tiere (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1c TierSchVersV)

1.1.5.1 Vorgesehene Tierarten, Begründung für die Wahl der Tierarten, Alter, ggf. Gewicht und Geschlecht (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1c TierSchVersV E). Beschreibung der Linien und deren Bezeichnung nach der internationalen Nomenklatur

- ggf. Anlage „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ beifügen -

Erläuterungen:

Tierart: Ratte (*Rattus norvegicus*)

Tierstamm: Sprague-Dawley Ratten, BMPR2 $\Delta 140Ex1/+$ -Ratten

Alter: 4-5 Wochen bei Versuchsbeginn

Geschlecht: männlich

Um neue Therapieoptionen zu untersuchen, ist es notwendig, ein dem menschlichen möglichst ähnliches Krankheitsbild an einem dem Menschen möglichst nahe stehendem Organismus zu imitieren. Die Ratte ist die sinnesphysiologisch am niedrigsten stehende Tierart an der dieses Vorhaben technisch möglich ist.

Als Versuchstiere sind männliche Sprague-Dawley-Ratten und BMPR2 $\Delta 140Ex1/+$ -Ratten (im Weiteren verlauf bezeichnet als BMPR $^{+/-}$ -Ratten) vorgesehen. Um die oben erwähnten Fragestellungen zu adressieren, ist es notwendig im vorliegenden Tierversuchsvorhaben männliche Ratten zu verwenden, die nicht einem hormonalen Zyklus (wie weibliche Tiere) unterliegen. Hormonzyklen haben großen Einfluss auf physiologische und pathologische Effekte im Körper und können dadurch Versuchsergebnisse massiv beeinflussen. Vor allem bei Versuchsvorhaben mit zusätzlicher pharmakologischer Intervention ist deshalb die Verwendung von männlichen Tieren unabdinglich.

BMPR $^{+/-}$ -Ratten haben einen Defekt im 140. Basenpaars (1. Exons) des BMP-Rezeptor (BMPR) und sind deshalb heterozygot für den BMPR. Aller Voraussicht nach spielt die heterozygote Deletion des BMPR eine Rolle bei PH-Patienten und sorgt für eine genetische Prädisposition zur Entwicklung der pulmonalen Hypertonie (Klasse 2). Aus der Literatur ist bekannt, dass dieser Stamm keine spontane PH entwickelt. Allerdings konnte im Modell der PAH (Klasse 1) ein verstärktes vaskuläres Remodeling nachgewiesen werden (Ranchoux et al, 2015). Aus diesem Grund eignet sich dieser Stamm, um das vaskuläre Remodeling der Pulmonalarterie im vorliegenden Versuchsvorhaben zu untersuchen. Eine genetische Prädisposition konnte für die PH (Klasse 2) bislang noch nicht nachgewiesen werden. Die BMPR $^{+/-}$ -Ratten stammen von einem Kooperationspartner aus Kanada und sind weder kommerziell verfügbar, noch wurden sie in Deutschland bereits gezüchtet. Die Tiere zeigen laut den Erfahrungen unserer Kooperationspartner keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich Körbergewicht, Lebenserwartung oder Gesundheitszustand auf. Auch sind bis dato keine pathologischen Befunde bekannt.

Andere Tierarten als Säugetiere sind für dieses Versuchsvorhaben nicht geeignet, da bei ihnen grundsätzlich andere anatomische und physiologische Verhältnisse als beim Menschen vorliegen. Die Durchführung der hier beantragten Experimente, d.h. die Induktion einer chronischen Linksherzinsuffizienz mittels suprakoronarem Aortenbanding und das Monitoring pulmonaler hämodynamischer Parameter, ist an der Ratte etabliert und in unserem Labor im Rahmen mehrerer vorhergegangener Tierversuchsanträge erfolgreich durchgeführt und optimiert worden (G0033/03; G0038/06, G0317/11). Durch die eigenen umfangreichen Erfahrungen mit dieser Methode, die sich in zahlreichen Publikationen niedergeschlagen haben (Hentschel et al., 2007; Yin et al, 2009; Kerem et al., 2010; Hoffmann et al., 2011), lassen sich die dargelegten Fragestellungen ohne Vorversuche untersuchen, die Verwendung zusätzlicher Tiere zur Systemvalidierung und –optimierung entfällt gänzlich

1.1.5.2 Vorgesehene Anzahl und Begründung für die Anzahl der Tiere einschließlich Angaben zur biometrischen Planung (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1c TierSchVersV F)

- ggf. Anlage „Statistisches Gutachten“ beifügen -
- ggf. Anlage Formblatt „Angaben zur biometrischen Planung“ verwenden -

Tierart	Gesamtzahl (incl. Reservetiere)
Sprague-Dawley-Ratten	900
BMPR2 $\Delta 140Ex1/+$ -Ratten	900

Versuchs- und Kontrollgruppen F)

Erläuterungen:

Allgemeiner Versuchsaufbau

Die vorliegende Studie ist in 5 verschiedene Teilversuche gegliedert (**Teilversuch A-E**). Jeder Teilversuch deckt 3 verschiedene Endpunktuntersuchungen (**Endpunkt 1, 2, 3**) ab, so dass sich aus den Teilversuchen A-E, jeweils 3 Studienarme pro Teilversuch ergeben, die im weiteren Verlauf als A1, A2, A3, B1, B2,...usw. bezeichnet werden. Insgesamt besteht die vorliegende Studie demnach aus 5 Teilversuchen à 3 Endpunkten macht insgesamt **15 einzelne Studienarme**. Eine detaillierte Übersicht über alle Teilversuche, Studienarme, Endpunkte, Tiergruppen und -zahlen findet sich in diesem Absatz. Der genaue zeitliche Ablauf für jeden einzelnen Teilversuch findet sich ebenfalls weiter unten in diesem Absatz.

Die Teilversuche lauten:

- A** Pilotstudie zum zeitlichen Verlauf des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2.
- B** Umkehr des vaskulären Remodelings mittels "Debanding" des suprakoronaren Aortenbandings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2.
- C** Inhibition des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch Verteroporfir.
- D** Inhibition des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch den MRTF-A-Inhibitor CCG-1423.
- E** Inhibition des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch einen RUNX2-Inhibitor (CADD522).

Die Endpunkte lauten:

- 1** Histologie, Proteomics, Genomics
- 2** biomechanische Untersuchung
- 3** Isolation von weichen Muskelzellen aus der Pulmonalarterie

Die Aufteilung in 5 verschiedene Teilversuche ist notwendig, um die unter Punkt 1.1.1 und 1.1.2 erläuterten einzelnen Zielsetzungen erfüllen zu können.

Die vollständige Beantwortung der gestellten Fragestellungen ist nur möglich, wenn unterschiedliche Endpunktuntersuchungen in den einzelnen Teilversuchen durchgeführt werden. Uns ist bewusst, dass durch verschiedene Endpunktuntersuchungen die benötigte Tierzahl stark erhöht wird. Deshalb haben wir unter dem **Endpunkt 1** drei verschiedene Untersuchungen (Histologie, Proteomics, Genomics) zusammengefasst, deren Durchführung mit der gleichen Probe/am gleichen Organ möglich ist. Die histologischen Untersuchungen der Pulmonalarterie und des Herzens, als auch weiterer Organe, sowie die Analysen zum Protein- und Genexpressionsprofils finden post mortem statt und bedürfen keinerlei weiterer Intervention am Tier. Jedoch sollte das Tier zum Zeitpunkt der Probennahme nur geringe Stresslevel aufweisen, damit Gen- und Proteinexpressionslevel nicht verfälscht werden. Dieser Endpunkt soll grundsätzlich dazu dienen, die molekularen Veränderungen während des vaskulären Remodelings in der Pulmonalarterie zu charakterisieren.

Im **Endpunkt 2** soll post mortem eine biomechanische Untersuchung an der Pulmonalarterie durchgeführt werden und damit der Grad der Versteifung der Pulmonalarterie ermittelt werden. Diese Untersuchung gibt also den vaskulären Status bzw. die vaskuläre Funktion der Pulmonalarterie an, und ist deshalb für die phänotypische Charakterisierung der genannten Pathologie unabdinglich. Während der biomechanischen Untersuchung wird das Gewebe der Pulmonalarterie leider so stark beschädigt bzw. zerrissen, so dass keine weiteren molekularbiologischen Untersuchungen wie in Endpunkt 1 oder Zellisolationen wie in Endpunkt 3 möglich sind.

Der **Endpunkt 3** sieht die Zellisolation von weichen Gefäßmuskelzellen aus der Pulmonalarterie vor. Diese Untersuchung soll gezielt die Frage beantworten, ob Transdifferenzierungsprozesse in Gefäßmuskelzellen ursächlich sind für die Calcifizierung und damit ebenfalls ursächlich sind für die Versteifung der Pulmonalarterie während der PH. Die Pulmonalarterie besteht neben vielen weiteren Zellpopulationen, so dass eine isolierte Beobachtung der postulierten Transdifferenzierung im Gewebeverbund leider nicht möglich ist.

Alle Tiere werden zwei Mal wöchentlich gewogen und einem visuellen Gesundheitscheck unterzogen. In allen Studienarmen wird zur Induktion der PH mit Linksherzerkrankung ein suprakoronares Banding der Aorta zum Zeitpunkt t=0 durchgeführt („Banding“). Eine Kontrollgruppe, die lediglich eine Schein-Operation erhält („SHAM“) wird stets mitgeführt, um das Ausmaß der PH im Verhältnis zum

gesunden Tier erfassen zu können. Zum Zeitpunkt 9 Wochen ist das Modell abgeschlossen (siehe Teilversuche), zu diesem Zeitpunkt liegt unserer Erfahrung nach eine Linksherzinsuffizienz mit diastolischer Dysfunktion, sowie eine pulmonale Hypertonie mit deutlichem Gefäßumbau und endothelialer Dysfunktion bei den Ratten vor.

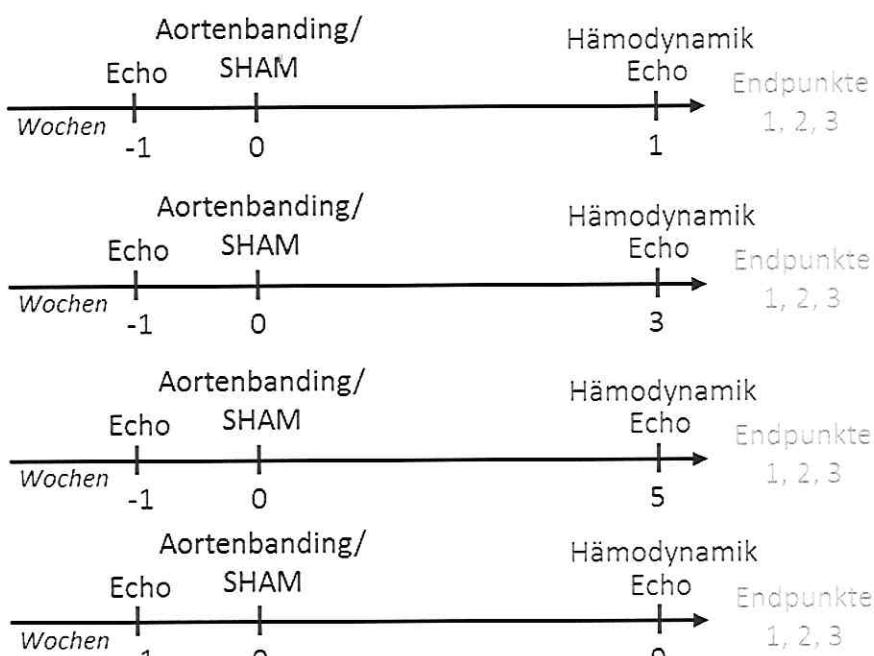
Zum Monitoren der kardialen und vaskulären Funktion *in vivo*, wird in allen Teilversuchen die Kleintier-Echokardiographie genutzt. Die Kleintier-Echokardiographie ist in unserer Gruppe seit Jahren etabliert und ist für das Tier nicht-invasiv. Alle Tiere bekommen vor dem suprakoronaren Aortenbanding eine echokardiographische Untersuchung um den basalen kardiovaskulären Status erfassen zu können. Abhängig von der Versuchsdauer wird in den einzelnen Teilversuchen eine echokardiographische Verlaufskontrolle durchgeführt (siehe Teilversuche C-E). Schließlich wird zum finalen Zeitpunkt nach 9 Wochen eine abschließende echokardiographische Kontrolluntersuchung durchgeführt. Am selben Tag wird die finale hämodynamische Untersuchung an den Tieren durchgeführt. Da bei der Kleintier-Echokardiographie hauptsächlich Flussgeschwindigkeiten bestimmt werden, die Formel-basiert in Drücke umgerechnet werden, ist als primärer Endpunkt in dieser Studie eine hämodynamische Untersuchung und die Nutzung eines Kathetersystems notwendig. Nach der hämodynamischen Untersuchung werden die Organe entsprechend dem jeweiligen Endpunkt der Gruppe präpariert.

Experimenteller Aufbau der Teilversuche A-E

A Pilotstudie zum zeitlichen Verlauf des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2.

Dieser Teilversuch dient der Erfassung der zeitlichen Dynamik des vaskulären Remodelings im Modell des suprakoronaren Aortenbandings. Dabei soll neben der kardiovaskulären Funktion vor allem auf molekularer Ebene das Zusammenspiel zwischen den beschriebenen Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

Hypothese: Durch das Aortenbanding kommt es zu einer Erhöhung des pulmonalen Aortendrucks, welcher über die Zeit im Zusammenspiel mit anderen Faktoren, das vaskuläre Remodeling in der Pulmonalarterie hervorruft. Auf molekularer Ebene lässt sich das vaskuläre Remodeling über die Zeit als verändertes mRNA- und Proteinexpressionsprofil nachweisen. Funktionell führen diese Veränderungen zum vaskulären Stiffening.



A Pilotstudie zum zeitlichen Verlauf des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2	1 (Histo)	1. 1 Woche	SD-Ratte	SHAM	12
	1 (Histo)	2. 1 Woche	SD-Ratte	Banding	12
	1 (Histo)	3. 3 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	1 (Histo)	4. 3 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	1 (Histo)	5. 5 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	1 (Histo)	6. 5 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	1 (Histo)	7. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	1 (Histo)	8. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	1 (Histo)	9. 1 Woche	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	1 (Histo)	10. 1 Woche	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	1 (Histo)	11. 3 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	1 (Histo)	12. 3 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	1 (Histo)	13. 5 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	1 (Histo)	14. 5 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	1 (Histo)	15. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	1 (Histo)	16. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
					n=192
	2 (Biomechanik)	1. 1 Woche	SD-Ratte	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	2. 1 Woche	SD-Ratte	Banding	12
	2 (Biomechanik)	3. 3 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	4. 3 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	2 (Biomechanik)	5. 5 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	6. 5 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	2 (Biomechanik)	7. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	8. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	2 (Biomechanik)	9. 1 Woche	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	10. 1 Woche	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	2 (Biomechanik)	11. 3 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	12. 3 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	2 (Biomechanik)	13. 5 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	14. 5 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	2 (Biomechanik)	15. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	2 (Biomechanik)	16. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
					n=192
3 (Zellisolation)	1 (Zellisolation)	1. 1 Woche	SD-Ratte	SHAM	12
	3 (Zellisolation)	2. 1 Woche	SD-Ratte	Banding	12
	3 (Zellisolation)	3. 3 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	3 (Zellisolation)	4. 3 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	3 (Zellisolation)	5. 5 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	3 (Zellisolation)	6. 5 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	3 (Zellisolation)	7. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM	12
	3 (Zellisolation)	8. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding	12
	3 (Zellisolation)	9. 1 Woche	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	3 (Zellisolation)	10. 1 Woche	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	3 (Zellisolation)	11. 3 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	3 (Zellisolation)	12. 3 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	3 (Zellisolation)	13. 5 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12
	3 (Zellisolation)	14. 5 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	12
	3 (Zellisolation)	15. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	12

Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes
 Anzeige von Eingriffen und Behandlungen an Tieren
 Stand: 02.09.2013

	3 (Zellisolation)	16. 9 Wochen	BMPR ^{+/}	Banding	12
					n=192

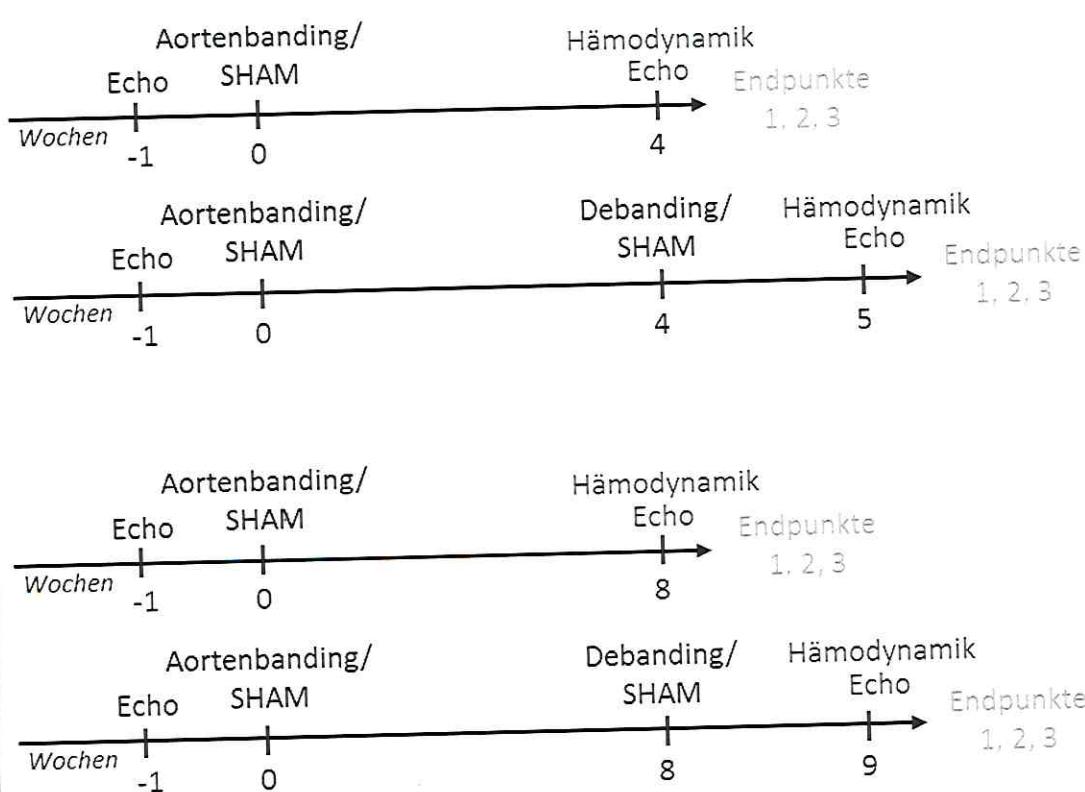
Studienarm A1 + A2 +A3: 576 Tiere

B Umkehr des vaskulären Remodelings mittels "Debanding" des suprakoronaren Aortenbandings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2.

Dieser Teilversuch dient vor allem dem Erkenntnisgewinn, ob ein einmal eingetretenes vaskuläres Remodeling infolge einer PH (Klasse 2) reversibel ist oder nicht. Dafür wird nach 4 bzw. nach 8 Wochen der Titan-Clip der zur Induktion der Linksherzinsuffizienz eingebracht wurde operativ entfernt („Debanding“). Diese Tiere werden eine weitere Woche beobachtet und erreichen damit dann die Versuchswochen 5 und 9, die auch schon im Teilversuch A adressiert wurden. Die Tiere werden dann in den Versuchswochen 5 bzw. 9 zunächst echokardiographisch und hämodynamisch, danach entsprechend dem jeweiligen Endpunkt untersucht. Zusätzlich sind Vergleiche mit der 5-Wochen- und 9-Wochen-Gruppe aus Teilversuch A möglich, bei denen das vaskuläre Remodeling ohne eine zweite chirurgische Intervention beurteilt werden kann. Hier bietet sich damit die Möglichkeit, den Einfluss der SHAM- bzw. Debanding-OP zu erfassen. Eine Gruppe von Tieren wird zum Zeitpunkt 4 Wochen bzw. 8 Wochen den finalen Untersuchungen unterzogen, um überprüfen zu können, ob und wie sich durch das Debanding das vaskuläre Remodeling verändert hat.

Auch hier muss eine Versuchsgruppe entsprechend dem Versuchsschema eine Schein-OP erhalten, bei der die Tiere lediglich narkotisiert und geöffnet werden, jedoch kein Titanclip um die Aorta gelegt wird. Diese Gruppe dient als Kontrollgruppe.

Hypothese: Das vaskuläre Remodeling während der PH (Klasse 2) ist umkehrbar durch das Debanding des suprakoronaren Aortenbandings.



Studienarm	Endpunkt	Gruppen	Stamm	Intervention	Tierzahl
B Umkehr	1 (Histo)	1. 4 Wochen	SD-Ratte	SHAM	8

des vaskulären Remodeling s mittels "Debanding" " des suprakoron aren Aortenband ings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2	1 (Histo)	2. 4 Wochen	SD-Ratte	Banding	8
	1 (Histo)	3. 4+1 Wochen	SD-Ratte	SHAM/SHAM	8
	1 (Histo)	4. 4+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/SHAM	8
	1 (Histo)	5. 4+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/Debanding	8
	1 (Histo)	6. 8 Wochen	SD-Ratte	SHAM	8
	1 (Histo)	7. 8 Wochen	SD-Ratte	Banding	8
	1 (Histo)	8. 8+1 Wochen	SD-Ratte	SHAM/SHAM	8
	1 (Histo)	9. 8+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/SHAM	8
	1 (Histo)	10. 8+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/Debanding	8
	1 (Histo)	11. 4 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	8
	1 (Histo)	12. 4 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	8
	1 (Histo)	13. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/SHAM	8
	1 (Histo)	14. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/SHAM	8
	1 (Histo)	15. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Debanding	8
	1 (Histo)	16. 8 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	8
	1 (Histo)	17. 8 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	8
	1 (Histo)	18. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/SHAM	8
	1 (Histo)	19. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/SHAM	8
	1 (Histo)	20. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Debanding	8
					n=160
	2 (Biomechanik)	1. 4 Wochen	SD-Ratte	SHAM	8
	2 (Biomechanik)	2. 4 Wochen	SD-Ratte	Banding	8
	2 (Biomechanik)	3. 4+1 Wochen	SD-Ratte	SHAM/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	4. 4+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	5. 4+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/Debanding	8
	2 (Biomechanik)	6. 8 Wochen	SD-Ratte	SHAM	8
	2 (Biomechanik)	7. 8 Wochen	SD-Ratte	Banding	8
	2 (Biomechanik)	8. 8+1 Wochen	SD-Ratte	SHAM/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	9. 8+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	10. 8+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/Debanding	8
	2 (Biomechanik)	11. 4 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	8
	2 (Biomechanik)	12. 4 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	8
	2 (Biomechanik)	13. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	14. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	15. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Debanding	8
	2 (Biomechanik)	16. 8 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	8
	2 (Biomechanik)	17. 8 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	8
	2 (Biomechanik)	18. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	19. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/SHAM	8
	2 (Biomechanik)	20. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Debanding	8
					n=160
	3 (Zellisolation)	1. 4 Wochen	SD-Ratte	SHAM	8
	3 (Zellisolation)	2. 4 Wochen	SD-Ratte	Banding	8
	3 (Zellisolation)	3. 4+1 Wochen	SD-Ratte	SHAM/SHAM	8
	3 (Zellisolation)	4. 4+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/SHAM	8
	3 (Zellisolation)	5. 4+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/Debanding	8
	3 (Zellisolation)	6. 8 Wochen	SD-Ratte	SHAM	8
	3 (Zellisolation)	7. 8 Wochen	SD-Ratte	Banding	8

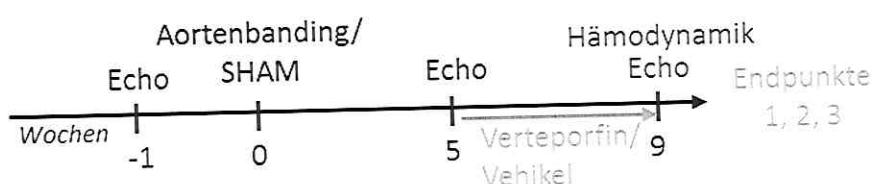
3 (Zellisolation)	8. 8+1 Wochen	SD-Ratte	SHAM/SHAM	8
3 (Zellisolation)	9. 8+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/SHAM	8
3 (Zellisolation)	10. 8+1 Wochen	SD-Ratte	Banding/Debanding	8
3 (Zellisolation)	11. 4 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	8
3 (Zellisolation)	12. 4 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	8
3 (Zellisolation)	13. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/SHAM	8
3 (Zellisolation)	14. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/SHAM	8
3 (Zellisolation)	15. 4+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Debanding	8
3 (Zellisolation)	16. 8 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM	8
3 (Zellisolation)	17. 8 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding	8
3 (Zellisolation)	18. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/SHAM	8
3 (Zellisolation)	19. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/SHAM	8
3 (Zellisolation)	20. 8+1 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Debanding	8
				n=160

Studienarm B1 + B2 +B3: 480 Tiere

C Inhibition des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch Verteporfin.

Dieser Teilversuch dient der Erforschung von Verteporfin, dass als Inhibitor des Signalmoleküls TAZ schon bei anderen Formen der PH vorteilhafte Effekte gezeigt hat. Die Tiere werden vier Wochen lang täglich einmal intraperitoneal mit Verteporfin (25 mg/kg KG) behandelt. Art, Dauer und Anwendung von Verteporfin sind der Literatur entnommen (Bertero et al., 2016).

Hypothese: Verteporfin verbessert das vaskuläre Remodeling und das vaskuläre Stiffening der Gefäße.



Studienarm C Inhibition des vaskulären Remodeling s während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch Verteprofin	Endpunkt	Gruppen	Stamm	Intervention	Tierzahl (n)
	1 (Histo)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	13
	1 (Histo)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	13
	1 (Histo)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/Verteprofin	13
	1 (Histo)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/Verteprofin	13
	1 (Histo)	5. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Vehikel	13
	1 (Histo)	6. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Vehikel	13
	1 (Histo)	7. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Verteprofin	13
	1 (Histo)	8. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Verteprofin	13
					n=104
	2 (Biomechanik)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	13
	2 (Biomechanik)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	13
	2 (Biomechanik)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/Verteprofin	13
	2 (Biomechanik)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/Verteprofin	13
	2 (Biomechanik)	5. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Vehikel	13
	2 (Biomechanik)	6. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Vehikel	13
	2 (Biomechanik)	7. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Verteprofin	13

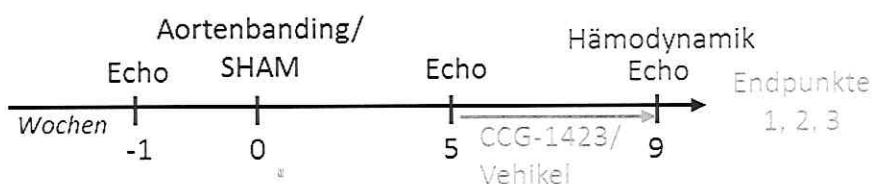
	2 (Biomechanik)	8. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Verteporfin	13
					n=104
	3 (Zellisolation)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	13
	3 (Zellisolation)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	13
	3 (Zellisolation)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/Verteporfin	13
	3 (Zellisolation)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/Verteporfin	13
	3 (Zellisolation)	5. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Vehikel	13
	3 (Zellisolation)	6. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Vehikel	13
	3 (Zellisolation)	7. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Verteporfin	13
	3 (Zellisolation)	8. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Verteporfin	13
					n=104

Studienarm C1 + C2 +C3: 312 Tiere

D Inhibition des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch den MRTF-A-Inhibitor CCG-1423.

Dieser Teilversuch dient der Erforschung der Wirksamkeit von CCG-1423, dass als Inhibitor des Signalmoleküls MRTF-A schon bei anderen Formen der PH vorteilhafte Effekte gezeigt hat. Die Tiere werden vier Wochen lang einmal täglich intraperitoneal mit CCG-1423 (0,15 mg/kg KG) behandelt. Art, Dauer und Anwendung von Verteporfin sind der Literatur entnommen (Zheng et al., 2017).

Hypothese: CCG-1423 verbessert das vaskuläre Remodeling und das vaskuläre Stiffening der Gefäße.



Studienarm	Endpunkt	Gruppen	Stamm	Intervention	Tierzahl (n)
D Inhibition des vaskulären Remodeling s während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch den MRTF-A- Inhibitor CCG-1423	1 (Histo)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	9
	1 (Histo)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	9
	1 (Histo)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/ CCG-1423	9
	1 (Histo)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/ CCG-1423	9
	1 (Histo)	5. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Vehikel	9
	1 (Histo)	6. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Vehikel	9
	1 (Histo)	7. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/ CCG-1423	9
	1 (Histo)	8. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/ CCG-1423	9
					n=72
	2 (Biomechanik)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	9
	2 (Biomechanik)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	9
	2 (Biomechanik)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/ CCG-1423	9
	2 (Biomechanik)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/ CCG-1423	9
	2 (Biomechanik)	5. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Vehikel	9
	2 (Biomechanik)	6. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Vehikel	9
	2 (Biomechanik)	7. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/ CCG-1423	9
	2 (Biomechanik)	8. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/ CCG-1423	9
					n=72

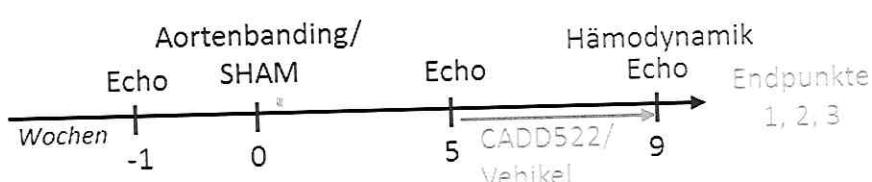
	3 (Zellisolation)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	9
	3 (Zellisolation)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	9
	3 (Zellisolation)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/ CCG-1423	9
	3 (Zellisolation)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/ CCG-1423	9
	3 (Zellisolation)	5. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Vehikel	9
	3 (Zellisolation)	6. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Vehikel	9
	3 (Zellisolation)	7. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/ CCG-1423	9
	3 (Zellisolation)	8. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/ CCG-1423	9
					n=72

Studienarm D1 + D2 +D3: 216 Tiere

E Inhibition des vaskulären Remodelings während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch einen RUNX2-Inhibitor (CADD522).

Dieser Teilversuch dient der Erforschung der Wirksamkeit von CADD522, dass als Inhibitor des Transkriptionsfaktors RUNX2 voraussichtlich die Transdifferenzierung der Gefäßmuskelzellen und damit auch die Calcifizierung der Gefäße verhindert. Die Tiere werden vier Wochen lang einmal täglich intraperitoneal mit CADD522 (10 mg/kg KG) behandelt. CADD522 ist eine neuartige Substanz, die bislang lediglich zur Therapie von Tumoren eingesetzt wurde. Das Tumorwachstum konnte im experimentellen Tiermodell durch die Gabe von CADD522 stark eingedämmt werden. Es wurde CADD522 noch gezeigt werden konnte, dass sie das Tumorwachstum inhibiert. Allerdings wurde CADD522 noch nicht im kardiovaskulären Bereich angewandt, da es sich um eine Neuentwicklung handelt (Kim et al., 2017). In Dosis-Findungsversuchen zu CADD522 gab es bis zur höchsten getesteten Dosierung von 20 mg/kg keinen Effekt von CADD522 auf das Körpergewicht der Tiere oder auf den generellen Gesundheitszustand der Tiere (Kim et al., 2017).

Hypothese: CADD522 verbessert das vaskuläre Remodeling und das vaskuläre Stiffening der Gefäße.



Studienarm E Inhibition des vaskulären Remodeling s während der pulmonalen Hypertonie Typ 2 durch einen RUNX2- Inhibitor	Endpunkt	Gruppen	Stamm	Intervention	Tierzahl (n)
	1 (Histo)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	9
	1 (Histo)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	9
	1 (Histo)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/ CCG-1423	9
	1 (Histo)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/ CCG-1423	9
	1 (Histo)	5. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/Vehikel	9
	1 (Histo)	6. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/Vehikel	9
	1 (Histo)	7. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	SHAM/ CCG-1423	9
	1 (Histo)	8. 9 Wochen	BMPR ⁺⁻	Banding/ CCG-1423	9
					n=72
	2 (Biomechanik)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	9
	2 (Biomechanik)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	9
	2 (Biomechanik)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/ CCG-1423	9
	2 (Biomechanik)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/ CCG-1423	9

2 (Biomechanik)	5. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	SHAM/Vehikel	9
2 (Biomechanik)	6. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	Banding/Vehikel	9
2 (Biomechanik)	7. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	SHAM/ CCG-1423	9
2 (Biomechanik)	8. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	Banding/ CCG-1423	9
				n=72
3 (Zellisolation)	1. 9 Woche	SD-Ratte	SHAM/Vehikel	9
3 (Zellisolation)	2. 9 Woche	SD-Ratte	Banding/Vehikel	9
3 (Zellisolation)	3. 9 Wochen	SD-Ratte	SHAM/ CCG-1423	9
3 (Zellisolation)	4. 9 Wochen	SD-Ratte	Banding/ CCG-1423	9
3 (Zellisolation)	5. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	SHAM/Vehikel	9
3 (Zellisolation)	6. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	Banding/Vehikel	9
3 (Zellisolation)	7. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	SHAM/ CCG-1423	9
3 (Zellisolation)	8. 9 Wochen	BMPR ^{+/−}	Banding/ CCG-1423	9
				n=72

Studienarm E1 + E2 +E3: 216 Tiere

Tierzahlgesamt:

Studienarm A: 576
 Studienarm B: 480
 Studienarm C: 312
 Studienarm D: 216
Studienarm E: 216
Total: 1800

Angaben zur biometrischen/statistischen Planung

Aufgrund des Umfangs des vorliegenden Tierversuchsvorhabens, wurde die biostatistische Planung in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin durchgeführt. Die direkte Ansprechpartnerin ist Frau Andrea Stroux, Dipl. Math.

Erläuterungen:

Die ausführliche Fallzahlplanung findet sich als Anlage im Anhang. Die Fallzahlplanung wurde für jeden Teilversuch einzeln durchgeführt. Alle Einzelheiten zu Fehler 1. Und 2. Art, sowie Informationen zur biologisch relevanten Differenz und Effektstärke finden sich für jeden Teilversuch/Studienarm einzeln im biostatistischen Gutachten im Anhang.

Hauptzielgröße(n):

Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks
 Siehe auch biostatistisches Gutachten im Anhang

Nebenzielgröße(n):

Gefäßremodeling: genauer die mediale Wanddicke pulmonaler Arteriolen
 Siehe auch biostatistisches Gutachten im Anhang

Studententyp

- a) Orientierungsstudie
 b) Vergleichsstudie

Es werden folgende biometrische Verfahren zur Auswertung eingesetzt:
 Siehe biostatistisches Gutachten im Anhang

Die vorgesehene Tierzahl und Gruppengröße ist zur statistischen Absicherung mit

- einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art von
Siehe biostatistisches Gutachten im Anhang
 - einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art von
Siehe biostatistisches Gutachten im Anhang
 - einer biologisch relevanten Differenz
Siehe biostatistisches Gutachten im Anhang
 - Varianz oder Effektstärke (mit Angabe des genutzten Parameters, z. B. Effektstärke nach Cohen)
Siehe biostatistisches Gutachten im Anhang
- notwendig

Die biometrische Planung ist ggf. durch das Gutachten einer Statistikerin/eines Statistikers zu erläutern.

Weitere Erläuterungen:

1.1.5.3 Herkunft der Tiere

Die Tiere werden über die Tierzuchteinrichtung der Charité (FEM) oder über Charles River, Sulzfeld, bezogen.

1.1.5.4 Handelt es sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere (§§ 19 bis 24 TierSchVersV)? G)

X Ja

Aus welcher/welchen Zucht/Zuchten (Name und Anschrift) stammen die Tiere?
Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Krahmerstr. 6-10
12207 Berlin

- Nein
- Es handelt sich um Landwirtschaftliche Nutztiere H)
- Antrag auf Zulassung einer Ausnahme nach § 19 Abs. 1 Satz 2, § 20 Abs. 1 Satz 2 oder § 21 Satz 2 TierSchVersV ist gesondert beigefügt
- Antrag auf Zulassung einer Ausnahme nach § 19 Abs. 1 Satz 2 bzw. § 20 Satz 2 TierSchVersV wird hiermit gestellt

Erläuterungen:

Trifft nicht zu.

1.1.5.5 Die vorgesehenen Tiere wurden bereits in einem Versuchsvorhaben im Sinne des § 18 TierSchVersV verwendet H)

- Im Falle der Verwendung von Primaten Anlage 5 beifügen –

Ja X Nein

Wenn Ja, Beschreibung der Art, Dauer und Belastung der bislang erfolgten Eingriffe an den betreffenden Tieren, Aktenzeichen und Angabe der zuständigen Behörde; tierärztliche Empfehlung beifügen (§ 18 Abs. 1 Nr. 4 TierSchVersV):

1.2 Angaben zur praktischen Durchführung

1.2.1 Ort der Versuchstierhaltung und Ort der Durchführung, vorgesehener Beginn (Datum) und voraussichtliche Dauer des Versuchsvorhabens (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1 e TierSchVersV) I)

Ort der Versuchstierhaltung mit Anschrift und Gebäude-/Raumnummer:

Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) im CharitéCrossOver-Gebäude (CCO)
Charitéplatz 1, 10437 Berlin, Intern: Virchowweg 6
Tierhaltung in der 2. Etage
ZH 169

Ort der Versuchsdurchführung mit Anschrift und Gebäude-/ Raumnummer:
Institut für Physiologie, Campus Charité Mitte
CharitéCrossOver-Gebäude (CCO)
Charitéplatz 1, 10437 Berlin, Intern: Virchowweg 6
Labore in der 6. Etage, Räume 311, 315

Beginn:

ab Genehmigung

Dauer:

5 Jahre

Beschreibung der Haltungsbedingungen und der Vorbereitung der Tiere auf den Versuch (§ 8)

1.2.2 Abs. 1 Satz 2 Nr. 5 TierSchG J)

Erläuterungen:

Die Unterbringung der Tiere erfolgt in der Tierhaltung ZH 169 am Campus Charité Mitte der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10437 Berlin, CCO-Gebäude Virchowweg 6 unter der Aufsicht der Tierpfleger, die über die erforderlichen Kenntnisse hinsichtlich der artgerechten Pflege und Ernährung verfügen. Die tiermedizinische Versorgung wird durch die Forschungseinrichtungen der Charité gewährleistet. Die Tiere stehen unter Aufsicht der hier tätigen Tierärzte, die über die erforderlichen Kenntnisse hinsichtlich der artgerechten Pflege und Ernährung verfügen. Die Käfige sind mit staubarmer, strukturierter Holzeinstreu, die regelmäßig gewechselt wird, sowie weiterem Enrichment (Unterschlupfmöglichkeit in Form einer Röhre; Zellstoff zur eigenen Strukturierung des Lebensraumes bzw. als Nestbaumaterial) ausgestattet. Die Tiere erhalten Trinkwasser und spezielles Haltungsfutter ad libitum. Lichtverhältnisse und Raumklima sind den Bedürfnissen der Tiere angepasst (Raumtemperatur 20-24°C, relative Luftfeuchtigkeit 45-65%, 12-stündiger Hell/Dunkel-Rhythmus). Das soziale Umfeld wird durch die Gruppenhaltung mit Artgenossen gewährleistet. Die Haltungsbedingungen basieren auf den geltenden Vorgaben der EU-Richtlinie 2010/63/EU, der Leitlinie 2007/526/EG und den Empfehlungen des Ausschusses für tiergerechte Labortierhaltung der GV-SOLAS für die Haltung von Mäusen.

Es sollen durch die als schwer zu beurteilende Belastung der Tiere nur Untersuchungen und Eingriffe durchgeführt werden, die tatsächlich unerlässlich für den Erkenntnisgewinn dieses Versuchsvorhabens sind. Deshalb wird neben dem Gewichtsmonitoring und der Echokardiographie auf weitere Untersuchungen wie Blutentnahmen (außer am finalen Tag) zur Verlaufskontrolle verzichtet. Selbstverständlich ist für uns die Haltung der Tiere in kleinen sozialen Gruppen und die Anreicherung der Käfige mit Unterschlupfmöglichkeiten (Refinement). Das Refinement ist nicht nur aus tierschützerischer Sicht ein ganz besonders wichtiger Punkt, sondern auch aus wissenschaftlicher Sicht, da jede zusätzliche Belastung der Tiere die Ergebnisse des Versuchs verfälschen könnte.

1.2.3 Beschreibung des Hygienemanagements J)

Hygienestatus der Versuchstiere/der Tierhaltung:

Erläuterungen:

Das Hygienekonzept der FEM sieht eine strikte Trennung von zentralen SPF-Zuchtbereichen und dezentralen Experimentalbereichen vor. In die Zuchtbereiche werden Tiere nur über Embryotransfer oder Hysterektomie nach erfolgreicher Isolatorquarantäne eingeschleust. In den zentralen Zuchtbereichen der FEM ist ein strikter, spezifiziert pathogenfreier Hygienestatus der Versuchstiere vorgesehen und es wird in Anlehnung an die FELASA Richtlinien vier Mal jährlich untersucht.

Hygienestatus der Versuchstiere/der Tierhaltung:
s. Gesundheitszeugnis mit Historie im Anhang.

Hygienemonitoring:

Erläuterungen:

An den dezentralen Experimentalstandorten wird zweimal jährlich entsprechend der FELASA untersucht. Zusätzlich werden monatlich Abklatschproben auf Oxyuren untersucht. In die Experimentalbereiche dürfen Tiere nur von kommerziellen Züchtern mit SPF Status oder aus den zentralen SPF-Zuchtbereichen eingestellt werden. Die Einstellung von Tiere aus anderen Tierhaltungen ist nur nach Überprüfung der Kompatibilität des Hygienestatus durch die Hygienebeauftragte gestattet.

Wurden in dem Tierhaltungsbereich aktuell Organismen nachgewiesen, die gemäß Hygienemanagement nicht vorhanden sein sollen?

Ja Nein wurde nicht untersucht (bitte begründen)

Wenn Ja: Um welche Keime handelt es sich?

Inwieweit ist bekannt, ob diese die Versuchsergebnisse beeinflussen können?

Welche Maßnahmen werden ergriffen, um eine Infektion der Tiere für das beantragte Versuchsvorhaben mit den oben genannten Keimen zu verhindern?

Erläuterungen:

Trifft nicht zu.

1.2.4 Beschreibung der praktischen Durchführung aller Eingriffe und Behandlungen bezogen auf die jeweilige Versuchsgruppe in ihrer Art und Dauer und Berücksichtigung des Betäubungsverfahrens; detaillierte Darstellung sämtlicher Maßnahmen mit zeitlichem Verlauf (§ 17 i. V. m. § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1d TierSchVersV K)

Erläuterungen:

Induktion der Linksherzinsuffizienz:

Die Operation zur Induktion der Linksherzinsuffizienz mittels suprakoronaren Aortenbandings erfolgt nach der von uns publizierten Methode, unter Vollnarkose und sterilen Bedingungen in einem extra dafür eingerichteten Operationsraum (Hentschel et al., 2007; Yin et al, 2009; Kerem et al., 2010; Hoffmann et al., 2011). Nach Narkose durch eine kombinierte intraperitoneale Verabreichung von Ketamin (87 mg/kg KG) und Xylazin (13 mg/kg KG) werden die Ratten auf eine 37°C warme Heizmatte gelagert und über eine Atemmaske mit reinem Sauerstoff beatmet. Eine ausreichende Narkosetiefe wird durch regelmäßige Testung des Zwischenzehenreflexes überprüft. Einer Austrocknung der Cornea über den Narkosezeitraum wird durch Eintropfen eines Augengels vorgebeugt. Nach Desinfektion der Haut und linksthorakalem Hautschnitt (ca. 7 mm Länge) wird der 2. Interkostalraum links durch vorsichtige Mobilisation der bedeckenden Muskelschichten freigelegt und auf einer Länge von ca. 4 mm eröffnet. Dies ermöglicht den operativen Zugriff zur Herzbasis und das Anbringen eines Titan-Clips mit einem definierten Innendurchmesser von 0.8 mm um die Aorta ascendens oberhalb des Abgangs der Herzkranzarterien. Anschließend wird die Brustwand in 2 Schichten durch Einzelknopfnaht verschlossen. Die Gesamtdauer des Eingriffs beträgt ca. 10 min. Bis zum vollständigen Abklingen der Narkosewirkung verbleiben die Tiere auf der Heizmatte, ihre Spontanatmung wird kontinuierlich überwacht. Bis zum vollständigen Erwachen verbleiben die Tiere in Einzelkäfigen und werden anschließend wieder in ihre, ihnen bereits vertrauten Gemeinschaftskäfige mit freiem Zugang zu Wasser und artgerechtem Trockenfutter verbracht. 30 min vor Operationsbeginn und einmal täglich an den ersten 3 postoperativen Tagen erhalten die Ratten 5 mg/kg KG Carprofen s.c. zur postoperativen Analgesie.

Echokardiographische Untersuchung zur Erfassung der kardialen und vaskulären Funktion:

Die fortschreitende Funktionseinschränkung des Herzens und der Gefäße soll durch das nicht-invasive bildgebende Verfahren der Kleintier-Echokardiographie überwacht werden. Dafür sollen die Tiere einmalig vor dem/der Banding/SHAM-OP echokardiographisch untersucht werden, um einen 0-Wert zu generieren. Im weiteren Verlauf soll je nach Versuchsdauer (in den einzelnen Teilversuchen gekennzeichnet) eine einmalige Verlaufskontrolle durchgeführt werden, um die Progression der Linksherzinsuffizienz als auch die Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks zu überprüfen. In allen Studienarmen wird vor der finalen häodynamischen Untersuchung eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt.

Die echokardiographische Untersuchung ist ein nicht-invasives Standardverfahren der Bildgebung. Zur Durchführung der echokardiografischen Untersuchung werden die Tiere mit einer 1,5% Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt. Die Untersuchung wird mit dem Echogerät Vevo700 (VisualSonics Inc.,

Toronto, ONT, Canada) durchgeführt. Die Ratten werden in Rückenlage fixiert und der Thorax enthaart (Veet Enthaarungscreme oder Rasur). Das Herz wird parasternal in der kurzen Achse (short axis) und der langen Achse (long axis) dargestellt. Des Weiteren werden zur Kalkulation der links- und rechtsventrikulären Kammerdimension auf Höhe der Papillarmuskeln Messungen im M-Mode (Short axis und long axis) durchgeführt. Außerdem werden Doppler-Untersuchungen und Strain-Analysen mit Hilfe von Speckle-Tracking-Echokardiographie durchgeführt. Diese erweiterten Analyse-Verfahren dienen der Feststellung von frühen pathologischen Veränderungen, die mit der Anwendung von konventioneller Echokardiographie, sprich B- und M-Mode-Bildern, nicht möglich ist.

Zusätzlich zum kardialen Status der Tiere wird die vaskuläre Funktion erfasst. Hierzu werden die „großen“ Blutgefäße der Tiere wie Pulmonalarterie, Aorta und Carotiden echokardiographisch aufgenommen und die Flussgeschwindigkeiten gemessen. Formel-basiert, können Flussgeschwindigkeiten in Drücke umgerechnet werden.

Alle echokardiographischen Verfahren werden mit möglichst geringem zeitlichem Aufwand und damit auch mit möglichst geringer Belastung für das Tier durchgeführt, um die Dauer der Narkose für jedes Einzeltier auf ein Minimum zu beschränken. Die echokardiografischen Messungen werden nach den von der American Society of Echocardiography (ASE) festgelegten Standards durchgeführt.

Hämodynamische Untersuchung:

Zum entsprechenden Messzeitpunkt (je nach Teilversuch) erfolgt die invasive Messung hämodynamischer Parameter. Hierzu werden die Versuchstiere durch die intraperitoneale Verabreichung einer Triple-Kombination von Medetomidin (0.5 mg/kg KG, Domitor®), Fentanyl (0.05 mg/kg KG) und Midazolam (5 mg/kg KG, Dormicum®) narkotisiert. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgt nach erfolgreicher Etablierung eines intravenösen Zugangs (s.u.) durch intravenöse Infusion der Triple-Kombination Fentanyl/Midazolam/Medetomidin (0.025/2.5/0.25 mg/kg KG/hr).

Nach Sicherstellung einer ausreichenden Narkosetiefe durch die Überprüfung des Zwischenzehenreflexes werden die Ratten tracheotomiert und über eine 16G Kanüle mit Raumluft beatmet. Anschließend erfolgt die chirurgische Implantation jeweils eines Polyethylenkatheters in die Arteria carotis dextra und in die Vena jugularis sinistra zur Messung des arteriellen und zentralvenösen Blutdrucks, sowie zur intravenösen Aufrechterhaltung der Narkosetiefe. Über die rechte Jugularvene wird ein 2F Mikrotip-Millarkatheter in den rechten Ventrikel vorgeschoben, um den rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP) als sensitiven Indikator einer pulmonalen Hypertonie zu messen. Anschliessend werden die Tiere in Narkose durch eine intravenös verabreichte Überdosis Ketamin/ Xylazin getötet. Vom Zeitpunkt des Narkotisierens der Ratte bis zur Verabreichung der Überdosis Ketamin/Xylazin vergehen in der Regel maximal 30min.

Gewichtsmonitoring

Das Gewicht der Tiere soll zweimal pro Woche überprüft werden. Diese Messung dient gleichzeitig der regelmäßigen Gesundheitskontrolle jedes einzelnen Tieres.

Organ- und Blutentnahme (Endpunkt 1):

Post mortem wird der Thorax eröffnet, die Pulmonalarterie über den rechten Ventrikel kanüliert, und die Lunge mit 4% Paraformaldehyd zur Fixierung für 30 min perfundiert, sodann entnommen und bis zur anschließenden Paraffineinbettung für 12 h in 4% Paraformaldehyd gelagert. Das Herz wird entnommen, der rechte Ventrikel wird von Septum und linkem Ventrikel getrennt, und das Rechtsventrikuläre Gewicht bezogen auf das Körpergewicht als Maß der PH-assoziierten rechtsventrikulären Hypertrophie gravimetrisch ermittelt. In verschiedenen Geweben wie Herz, Lunge und Gefäßen erfolgen immunhistologische Aufarbeitungen, sowie eine Bestimmung des Genexpressionsprofils. Hierfür werden etablierte Zielgene und -proteine analysiert.

Biomechanische Untersuchungen (Endpunkt 2):

Für die biomechanische Untersuchung der Pulmonalarterie wird die Pulmonalarterie nach Abschluss der hämodynamischen Untersuchung entnommen, ohne dass die Tiere nochmals erwachen. Dafür wird der Thorax der Tiere geöffnet und die Pulmonalarterie frei präpariert und *ex vivo* in einen Myographen eingespannt. Mit Hilfe des Myographen kann die Dehnung/Elastizität eines Muskels oder Gewebeteilstücks erfasst werden und damit die Versteifung des Gefäßes erfasst werden. Diese Untersuchung dient vordergründig der Erfassung der vaskulären Gefäßfunktion *ex vivo*.

Isolation von Gefäßmuskelzellen (Endpunkt 3):

Die Isolation der Gefäßmuskelzellen aus der Pulmonalarterie wird direkt nach der hämodynamischen Untersuchung der Tiere durchgeführt, ohne dass die Tiere nochmals erwachen. Herz und Lunge

werden nach dem Öffnen des Thorax gemeinsam entnommen, die Pulmonalarterie präpariert und im Weiteren *ex vivo* über mehrere Waschschriften und enzymatische Abbauschritte die Gefäßmuskelzellen isoliert. Anschließend findet eine molekularbiologische Analyse von Gen- und Proteinexpressionsprofilen in den Gefäßmuskelzellen statt.

Debanding (Teilversuch B):

Vier bzw. acht Wochen nach Induktion der Linksherzinsuffizienz wird eine zweite Operation zum „Debanding“ durchgeführt, die vom Aufbau her der ersten gleicht. Die Tiere werden mit Hilfe einer kombinierten Narkose Ketamin (87 mg/kg KG, i.p.) und Xylazin (13 mg/kg KG, i.p.) auf einer 37°C warmen Heizmatte gelagert und narkotisiert. Eine ausreichende Narkosetiefe wird durch regelmäßige Testung des Zwischenzehenreflexes überprüft. Einer Austrocknung der Cornea über den Interkostalraum links durch vorsichtige Mobilisation der bedeckenden Muskelschichten erneut freigelegt und auf einer Länge von ca. 4 mm eröffnet. Der zuvor angebrachte Titan-Clip wird dann mit Hilfe eines Micro-Nadelhalters senkrecht zur Ebene in der er angebracht wurde gegriffen und vorsichtig gespreizt und dadurch geöffnet. Nach dem Öffnen kann der Clip problemlos über die vorsichtig gespreizt und dadurch geöffnet. Nach dem Öffnen kann der Clip problemlos über die verschlossen und die operative Nachsorge wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Durchführung der Operation dauert ca. 20 Minuten.

Die Methode wurde in der Vergangenheit mehrfach publiziert und ihre Mortalität mit 3,4% angegeben (Zhang et al., 2013). Aufgrund der bereits hohen Tierzahl im vorliegenden Versuchsvorhaben und der als vernachlässigbar zu betrachtenden Mortalitätsrate, möchten wir davon Abstand nehmen zu diesem Zeitpunkt Reserve-Tiere für diesen Teilversuch zu beantragen.

Pharmakologische Intervention (Teilversuche C-E):

Die pharmakologische Intervention in den Versuchssarmen C-E wird über einen Zeitraum von vier Wochen einmal täglich durchgeführt. Die pharmakologische Intervention startet nach der echokardiographischen Verlaufskontrolle in Woche 5 (t=35 Tage). Die Inhibitoren werden in den angegebenen Dosierungen intraperitoneal einmal täglich verabreicht: Vertepron 25 mg/kg KG, CCG-1423 (0,15 mg/kg KG) und CADD522 (10 mg/kg KG).

1.2.5 Werden schmerzhafte Eingriffe ohne Betäubung durchgeführt?

Ja X Nein

Wenn Ja

Erläuterungen:

Trifft nicht zu.

1.2.6 Beschreibung und Begründung von Maßnahmen zur Schmerzlinderung bzw. deren Unterlassung (§ 17 TierSchVersV);

-Angaben nicht erforderlich für Anzeigen nach § 8a Abs. 3 TierSchG (Versuche an Zehnfußkrebsen) -

Erläuterungen:

Während der chirurgischen Eingriffe werden die Tiere mit einer Mischung aus Ketamin und Xylacina i.p. narkotisiert. Bei Ketamin handelt es sich um ein langwirksames (8-10 Stunden) Injektionsnarkotikum, was für diese Art des Eingriffes und die Messung gut geeignet ist. Xylazin ist ein in der Tiermedizin gängiges und gut verträgliches Analgetikum und wird häufig zur operativen Schmerzlinderung angewendet.

Die hämodynamischen Untersuchungen werden mit Hilfe einer Triple-Kombination von Medetomidin (0.5 mg/kg KG, Domitor®), Fentanyl (0.05 mg/kg KG) und Midazolam (5 mg/kg KG, Dormicum®) durchgeführt. Auch hier ist eine ausreichende Narkosetiefe durchgängig gewährleistet. Die hämodynamische Untersuchung ist eine finale Untersuchung aus der die Tiere nicht mehr erwachen. Für die echokardiographische Untersuchung wird Isofluran als kurzwirkasches Inhalationsanästhetikum angewendet.

1.2.7 Werden an einem Tier erheblich schmerzhafte und dauerhaft anhaltende Eingriffe oder Behandlungen durchgeführt, die nicht gelindert werden können?? (§ 25 Abs. 2 TierSchVersV);

-Angaben nicht erforderlich für Anzeigen nach § 8a Abs. 3 TierSchG (Versuche an Zehnfußkrebsen) -

Ja X Nein

Wenn Ja

Erläuterungen:

Trifft nicht zu.

1.2.8 Vorgesehene Maßnahmen und Kontrollen im Rahmen der medizinischen und tierärztlichen Versorgung z. B. Hormonsubstitution, Antibiose, Verbandswechsel, spezielle Haltungsbedingungen aufgrund hygienischer Anforderungen oder Erkrankungsneigungen der vorgesehenen Tiere

Erläuterungen:

Trifft nicht zu.

1.2.9 Beschreibung und Bewertung der Belastung (Intensität und Dauer von Schmerzen, Leiden oder Schäden), wissenschaftliche Begründung der Einstufung des Schweregrads nach Artikel 15 Abs. 1 i. V. m. Anh. VIII der RL 2010/63/EU bezogen auf die jeweilige Tierart und Versuchsgruppe in Anlehnung an die Ausführungen zu Ziff. 1.2.4 L) unter Benennung konkreter Abbruchkriterien. (In diesem Zusammenhang auch Darstellung Genotyp-bedingter Belastungen genetisch veränderter Tiere) (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2b TierSchVersV)

- bitte Anlage „Belastungstabelle“ beifügen -

- ggf. Anlage „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ beifügen bzw. prospektive Einschätzung der phänotypischen Belastung -

Erläuterungen:

Induktion der Linksherzinsuffizienz:

Die Induktion der Linksherzinsuffizienz mittels suprakoronarem Aortenbanding ist als starke Belastung für die Tiere anzusehen. Die chirurgische Intervention selbst wird unter Narkose durchgeführt. 30 min vor Operationsbeginn und einmal täglich an den ersten 3 postoperativen Tagen erhalten die Ratten 5 mg/kg KG Carprofen s.c. zur postoperativen Analgesie um unnötiges Leiden zu verhindern.

Echokardiographische Untersuchung zur Erfassung der kardialen und vaskulären Funktion:

Die echokardiografischen Untersuchungen dienen hauptsächlich der Überwachung der Herz- und Gefäßfunktionfunktion der Tiere. Die Untersuchung findet mit Hilfe einer leichten Isoflurannarkose statt, dauert ca. 10 bis 20 Minuten und gilt als nicht-invasives Standardverfahren. Die Tiere erwachen in der Regel schnell aus der Narkose, da es sich bei Isofluran um ein Inhalationsanästhetikum handelt. Die Belastung wird deshalb als gering eingestuft.

Hämodynamische Untersuchung:

Bei der hämodynamischen Untersuchung handelt es sich um eine finale Untersuchung und es kommt nicht zur Wiederherstellung der Lebensfunktion.

Debanding (Teilversuch B):

Auch das Debanding des suprakoronaren Aortenbanding sollte als starke Belastung für die Tiere angesehen werden. Trotz voraussichtlich geringer Mortalitätsraten ist eine erneute Narkose und die Eröffnung des Thorax' bei einem bereits moderat erkrankten Tier, als große Belastung anzusehen, auch wenn der Belastungsgrad durch lösen des Bandings verringert werden soll. Auch hier wird die chirurgische Intervention selbst wird unter Narkose durchgeführt. 30 min vor Operationsbeginn und einmal täglich an den ersten 3 postoperativen Tagen erhalten die Ratten 5 mg/kg KG Carprofen s.c. zur postoperativen Analgesie um unnötiges Leiden zu verhindern.

i.p.-Applikation (Teilversuche C-E)

Die i.p.-Applikation von Substanzen wird als geringe Belastung eingestuft, da es nur zu kurzen Zwangsmaßnahmen für das Tier kommt.

Die Gesamtbelastung des Versuchs wird als SCHWER eingestuft. Alle notwendigen Eingriffe und Behandlungen an den Tieren sind auf ein Mindestmaß reduziert, um die Tiere so wenig wie möglich durch die Eingriffe und Behandlungen per se bzw. durch Interaktion mit dem Experimentator zu stressen.

Das Wiegen erfolgt während des Umsetzens in einen sauberen Käfig und entspricht einer geringen Belastung. Dazu werden die Tiere kurzzeitig, während der neue Käfig fertiggestellt wird, in einen ein-streulosen Käfig auf die Waage verbracht. Das Umsetzen wird routinemäßig von geschulten Personen durchgeführt, allerdings ist es unvermeidbar, dass es über eine kurze Zeitspanne zu einer stressbedingten Belastung kommen kann.

1.2.10 Benennung konkreter Abbruchkriterien (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1. d) TierSchVersV)

- bitte Anlage „Score Sheet“ beifügen -

1.2.11 Aufzeichnungen (§ 9 Abs. 5 Satz 1 TierSchG i. V. m. § 29 TierSchVersV) M)

- bitte Aufzeichnungsmuster beifügen -

1.3 Ethische Vertretbarkeit des Versuchs (§ 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG) M)

1.3.1 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind (§ 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG)

| Erläuterungen:

Die PH infolge von Linksherzerkrankung stellt mit einer geschätzten Prävalenz von ca. 1800-3500/Mio eine häufige Erkrankung dar, die unbehandelt aufgrund der progressiven Entwicklung eines Rechtsherzversagens zum Tode führt (Rosenkranz et al., 2011). Neben einer hohen Letalität ist die PH infolge von Linksherzerkrankung häufig mit der Ausbildung schwerer Lungenödeme, die die Oxygenierung des Blutes und damit die Sauerstoffversorgung des Gewebes zusätzlich verschlechtern, und einer progressiven Druckbelastung des rechten Herzens verbunden, die durch eine Reduktion der Belastbarkeit bis hin zur Ruhedyspnoe zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität und einer hohen Morbidität der betroffenen Patienten führen. Das Auftreten einer pulmonalen Hypertonie, eines erhöhten pulmonal-vaskulären Gefäßwiderstandes oder eine daraus resultierende Dysfunktion des rechten Ventrikels werden daher bei einem Großteil der Patienten mit Linksherzinsuffizienz zum limitierenden Faktor für den Erfolg therapeutischer Interventionen und gelten als zentrale Indikatoren einer negativen Prognose (Ghio et al., 2001; Field et al., 2006; Meyer et al., 2010). Die therapeutischen Möglichkeiten für diesen Krankheitskomplex sind bislang ausgesprochen unbefriedigend und fokussieren in erster Linie auf die Behandlung der Herzinsuffizienz, die als ultima ratio die Herztransplantation vorsieht. Jedoch werden erfahrungsgemäß gerade Patienten mit fixierter PH infolge von Linksherzinsuffizienz wegen des höheren peri-operativen Risikos als Kandidaten zur Herztransplantation abgelehnt (Hosenpud et al., 2000).

Während in den letzten 20 Jahren in der Behandlung der pulmonal-arteriellen Hypertonie rasante Fortschritte zu verzeichnen waren, die zu einer deutlichen Zunahme der Lebenserwartung und Lebensqualität dieses Patientenkollektives durch die Einführung zahlreicher pharmakologischer Behandlungsoptionen geführt haben (Barst et al., 2009), blieb dieser Fortschritt für Patienten mit PH infolge von Linksherzerkrankung bisher aus. Daher ist es zwingend erforderlich, neue Behandlungsverfahren für die zahlreichen Patienten, die von diesem Krankheitsbild betroffen sind, zu entwickeln und zu erproben. Mit den von uns und anderen Arbeitsgruppen in vorangegangenen Studien nachgewiesenen beeinträchtigten Signalkaskaden während der PAH, bietet sich erstmals eine vielversprechende Möglichkeit, dieses Patientenkollektiv mit einer mechanistisch-orientierten pharmakologischen Therapie erfolgreich zu behandeln. Basis für jegliche Form der therapeutischen Intervention muss jedoch stets eine gute und fundierte Charakterisierung der pathophysiologischen Vorgänge, der zellulären Mechanismen sowie ihrer zeitlichen Abläufe im Rahmen des Krankheitsprozesses sein.

Der operative Eingriff zur Induktion einer Linksherzinsuffizienz durch suprakoronares Aortenbanding ist naturgemäß mit Schmerzen und Leiden der Versuchstiere verbunden. Diese werden jedoch durch den Einsatz starker Analgetika und Anästhetika während der Operation sowie potenter Analgetika in der postoperativen Phase entsprechend dem derzeitigen Wissensstand auf ein Minimum reduziert. Die weitere Beobachtungszeit von bis zu 9 Wochen kann im Wesentlichen als leidensfrei eingestuft werden. Der abschließende Eingriff, bei dem die Messung der hämodynamischen Parameter und die Entnahme der

Organe für die post mortem Analyse, findet wiederum unter Anästhesie und Analgesie ohne Wiedererwachen statt und fügt den Tieren keine erkennbaren zusätzlichen Leiden zu.

Unter Abwägung des zu erwartenden Erkenntnisgewinns und seiner erheblichen Relevanz für die Behandlung eines klinisch häufigen und letalen Krankheitsbildes gegenüber den medikamentös auf ein mögliches Mindestmaß reduzierten Belastungen der Tiere erscheint das vorgelegte Vorhaben ethisch vertretbar.

- 1.3.2 Bei länger anhaltenden oder sich wiederholenden erheblichen Schmerzen oder Leiden, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass das angestrebte Versuchsergebnis vermutlich für wesentliche Bedürfnisse von Mensch oder Tier einschließlich der Lösung wissenschaftlicher Probleme von hervorragender Bedeutung ist (§ 25 Abs. 1 TierSchVersV)**

Bei erheblichen Schmerzen oder länger anhaltenden Leiden, die nicht gelindert werden können, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die Durchführung des Tierversuchs wegen der Bedeutung der angestrebten Erkenntnisse unerlässlich ist (§ 25 Abs. 2 TierSchVersV).

- Angaben nicht erforderlich für Anzeigen nach § 8a Abs. 3 TierSchG (Versuche an Zehnfußkrebsen) -

Erläuterungen:

Trifft nicht zu.

1.4 Verfahren am Versuchsende (§ 28 TierSchVersV)

Beabsichtigter Verbleib der Tiere:

- Tötung während des Versuchs bzw. vor Erwachen aus der Narkose
 Tötung nach einer Beobachtungszeit von 9 Wochen
 Weiterleben der Tiere ohne Beeinträchtigung des Wohlbefindens.

Verbleib der Tiere nach dem Ausscheiden aus dem Versuch:

Tötungsverfahren (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1g TierSchVersV):

Die Tiere werden in Narkose durch eine intravenös verabreichte Überdosis Ketamin/ Xylazin getötet.

- 1.5 Bei Durchführung mehrerer gleichartiger Vorhaben nach § 8a Abs. 1 TierSchG die voraussichtliche Zahl der Vorhaben (§ 37 Abs. 1 TierSchVersV)**

Trifft nicht zu

2. Personelle Voraussetzungen

- 2.1 Leitung des Versuchsvorhabens und Stellvertretung (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2 TierSchG i. V. m. § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1 f TierSchVersV)**

2.1.1 Leiterin/Leiter des Tierversuchsvorhabens

Name:

Prof. Dr. Wolfgang M. Kübler

Beruf: Arzt, wissenschaftlicher Mitarbeiter

Nachweis der Ausbildung und der Kenntnisse und Fähigkeiten und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?):

ist beigefügt

ist bereits mit Geschäftszeichen bei dieser Genehmigungsbehörde vorgelegt worden (alternativ können auch Kopien von Bescheiden anderer Genehmigungsbehörden als Nachweis vorgelegt werden)

2.1.2 Stellvertretende Leitung des Tierversuchsvorhabens (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2 TierSchG i. V. m. § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1 f TierSchVersV)

Name:

Dr. Jana Grune

Beruf: wissenschaftliche Mitarbeiterin

Nachweis der Ausbildung und der Kenntnisse und Fähigkeiten und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?): Q

- ist beigefügt
- ist bereits mit Geschäftszeichen G0069/17 und G0443/12 bei dieser Genehmigungsbehörde vorgelegt worden (alternativ können auch Kopien von Bescheiden anderer Genehmigungsbehörden als Nachweis vorgelegt werden)

2.1.3 Versuchsplaner (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1 f TierSchVersV)

Name:

Prof. Dr. Wolfgang M. Kübler

Beruf: Arzt, wissenschaftlicher Mitarbeiter

Nachweis der Ausbildung, der Kenntnisse und Fähigkeiten und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?): Q

- ist beigefügt
- ist bereits mit Geschäftszeichen O 0158/01 und G 0033/03 bei dieser Genehmigungsbehörde vorgelegt worden (alternativ können auch Kopien von Bescheiden anderer Genehmigungsbehörden als Nachweis vorgelegt werden)

2.2 Personen, die bei Vorhaben nach § 8a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG die Lehrinhalte vermitteln Q), R)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Entfällt				

2.3 Personen, die bei Vorhaben nach § 8a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG ausgebildet werden S)

Name	Studienrichtung, Berufsausbildung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Entfällt				

2.4 Personen, die im Rahmen der Versuchsdurchführung Eingriffe und Behandlungen sowie Tötungen an Tieren durchführen R)

Sofern für einzelne Personen eine Ausnahmegenehmigung nach § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV erforderlich ist, verwenden Sie bitte das eigens dafür vorgesehene Formular R)

2.4.1 Personen mit abgeschlossenem Hochschulstudium (Nachweis beilegen)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Wolfgang Kübler	Medizin	Operative Eingriffe, Narkosen, i.p.-Injektionen, Echokardiographie, hämodynamische Untersuchungen, Blutentnahme	17 Jahre	O 0158/01 und G 0033/03
Arata Tabuchi	Medizin	Operative Eingriffe, Narkosen, i.p.-Injektionen, hämodynamische Untersuchungen	14 Jahre	O 0158/01
Lasti Erfinanda	Biologie	Narkosen, i.p.-Injektionen, hämodynamische Untersuchungen	7 Jahre	G 0028/07
Jana Grune	Pharmakologin/Toxikologin	Operative Eingriffe, Narkosen, i.p.-Injektionen, Echokardiographie, hämodynamische Untersuchungen, Blutentnahme	6 Jahre	G 0308/09
Sarah Weidenfeld	Biologie	Narkosen, i.p.-Injektionen, hämodynamische Untersuchungen, Blutentnahme	7 Jahre	T 0279/13
Laura Michalick	Biologie	Narkosen, i.p.-Injektionen, hämodynamische Untersuchungen, Blutentnahme	4 Jahre	G 0028/07
Christoph Bartz	Biotechnologie	i.p.-Injektionen, hämodynamische Untersuchungen, Blutentnahme	1 Jahr	O 0158/01
Benjamin Grimmer	Molekulare Lebenswissenschaften	i.p.-Injektionen, hämodynamische Untersuchungen, Blutentnahme	1 Jahr	T 0279/13

2.4.2 Doktorandinnen/Doktoranden bzw. Diplomandinnen/Diplomanden ohne Studienabschluss (Immatrikulationsbescheinigung beilegen)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Entfällt				

2.4.3 Nichtakademisches, technisches und pflegerisches Personal (Berufsnachweis beilegen)

Name	Berufsausbildung	Art der Versuchsbeteiligung (Behandlungen, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung bzw. Fachkenntnisse in Versuchstierhaltung und -pflege (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde

Entfällt				

2.5 Im Falle einer Betäubung Namen der Personen, welche die Betäubung durchführen oder die Durchführung der Betäubung im Rahmen einer Aus-, Fort und Weiterbildung beaufsichtigen T)

Name	Berufsausbildung	Tierexperimentelle, versuchstierkndl. Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Wolfgang Kübler	Professor für Physiologie	17 Jahre	O 0158/01 und G 0033/03
Arata Tabuchi	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Dr.)	14 Jahre	O 0158/01
Lasti Erfinanda	Wissenschaftlicher Mitarbeiter	7 Jahre	G 0028/07
Jana Grune	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Dr.)	6 Jahre	G 0308/09
Sarah Weidenfeld	Wissenschaftlicher Mitarbeiter	4 Jahre	T 0279/13
Laura Michalick	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Dr.)	7 Jahre	G 0028/07

2.6 Berechtigung der Personen zur Benutzung der Einrichtung, in der die Tierversuche durchgeführt werden (§ 8 Abs. 2 TierSchG)

2.6.1 Sind die genannten Personen bei der Einrichtung beschäftigt?

Ja Nein

2.6.2 Wenn Nein, sind sie mit Zustimmung der verantwortlichen Leitung der Einrichtung zur Benutzung der Einrichtung befugt?

Ja

Art und Umfang der Befugnisse (bitte schriftliche Bestätigung der verantwortlichen Leitung der Einrichtung beifügen):

--

2.7 Personen, die für die Pflege, Betreuung und medizinische Versorgung der Versuchstiere verantwortlich sind:

2.7.1 Namen, dienstliche Anschrift und Qualifikation der für die Pflege und Betreuung der Tiere verantwortlichen Personen:

Name	Dienstliche Anschrift	Qualifikation
Tierpflegerpersonal des CCO unter der Vorarbeiterin Frau hellwig-Träger	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) im CharitéCrossOver-Gebäude (CCO) Charitéplatz 1, 10437 Berlin , Intern: Virchowweg 6 Tierhaltung in der 2. Etage ZH 169	Tierpfleger, überwiegend mit Fachrichtung Forschung und Klinik

2.7.2 Namen, dienstliche Anschrift und Qualifikation der für die medizinische Versorgung verantwortlichen Personen:

Name	Dienstliche Anschrift	Qualifikation
Tierärztlicher Dienst der FEM	FEM Krahmerstr.6-10 12207 Berlin	Tierärzte und Fachtierärzte für Versuchstierkunde

2.7.3 Name und dienstliche Anschrift der Tierärztin/des Tierarztes, der/dem nach Abschluss des Versuchs die überlebenden Tiere der in § 28 Abs. 1 Satz 2 TierSchVersV genannten Arten vorgestellt werden:

Name	Dienstliche Anschrift
Entfällt	

3. Organisatorische Voraussetzungen

3.1 Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

Name	Dienstliche Anschrift, Telefon, Telefax, E-Mail
Frau Dr. Claudia Abramjuk	FEM-Charité Berlin Charitéplatz 1, 10437 Berlin Intern: CCO, Virchowweg 6 Tel: +49 30 450 576154 Fax: +49 30 450 576987 claudia.abramjuk@charite.de

3.2 Sind die Voraussetzungen zur Aufgabenerfüllung der Tierschutzbeauftragten/des Tierschutzbeauftragten gegeben (§ 10 TierSchG i. V. m. § 5 TierSchVersV)?

Ja Nein

3.3 Hat die Tierschutzbeauftragte/der Tierschutzbeauftragte eine Stellungnahme nach § 5 Abs. 4 Satz 2 Nr. 1 TierSchVersV abgegeben? (Angabe entfällt bei Anzeigen)

liegt bei wird nachgereicht

3.4 Sind die zur Durchführung des Versuchsvorhabens erforderlichen Anlagen, Geräte und sonstigen sachlichen Mittel vorhanden (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 3 TierSchG)? (Hierzu ist ein Nachweis erforderlich für den die Stellungnahme der /des Tierschutzbeauftragten in Frage kommt)

Ja Nein

3.5 Sind die notwendigen organisatorischen Voraussetzungen gegeben? (Hierzu ist ein Nachweis erforderlich, für den die Stellungnahme der /des Tierschutzbeauftragten in Frage kommt)

X Ja Nein

3.6 Ist eine den Anforderungen des § 2 TierSchG i. V. m. § 1 und § 15 TierSchVersV entsprechende Unterbringung und Pflege einschließlich der Betreuung der Tiere sowie ihre medizinische Versorgung sichergestellt an den jeweiligen Orten?

X Ja Nein Siehe Stellungnahme Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

Anonymisierung des Antrags (U):

Ich verzichte auf eine Anonymisierung des Antrags X Ja Nein

(Im Falle einer gewünschten Anonymisierung müssen die für die Kommission vorgesehenen Unterlagen anonymisiert und gekennzeichnet beigefügt werden)

Behördenspezifische Hinweise:

Ort, Datum

Unterschrift Antragstellerin/Antragsteller

Unterschrift der verantwortlichen Leiterin/des verantwortlichen Leiters des Vorhabens

Unterschrift der stellvertretenden Leiterin/des stellvertretenden Leiters des Vorhabens

Kenntnisnahme der Tierschutzbeauftragten/des Tierschutzbeauftragten (V)

Hinweise:

Bitte erkundigen Sie sich bei der zuständigen Genehmigungsbehörde wie viele Ausfertigungen des Antrages / der Anzeige vorgelegt werden müssen.

Der Antrag / die Anzeige sollte über den zuständigen Tierschutzbeauftragten/die zuständige Tierschutzbeauftragte der Einrichtung eingereicht werden.

Erläuterungen bitte fortlaufend in das Antrags-/Anzeigenformular einfügen – nicht auf Beiblatt!

-
- A) Die Bezeichnung des Vorhabens sollte möglichst knapp und prägnant formuliert sein, sowie maximal 2 Zeilen umfassen.
- B) Die Unerlässlichkeit eines Versuchsvorhabens ist durch eine kurze, keine Spezialkenntnisse voraussetzende, wissenschaftlich begründete Darstellung der Problem- oder Fragestellung darzulegen. Hierbei sind die einschlägigen, den derzeitigen Erkenntnisstand widerspiegelnden Publikationen (Literaturzitate) einzubringen und auf ihre Relevanz oder auch Widersprüchlichkeit im Hinblick auf das Forschungsprojekt zu diskutieren. Aus dieser Diskussion sollten in verständlicher Form neben der eigenen Standortbestimmung auch das weitere Procedere zur Problemlösung und der zu erwartende Erkenntnisgewinn hervorgehen. Hilfreich ist die Formulierung einer oder mehrerer Hypothesen.
Projektzusammenfassungen sind nicht erforderlich bei Anzeigen.
Die Projektzusammenfassung muss ggf. am Ende des Genehmigungsverfahrens in überarbeiteter Fassung erneut vorgelegt werden.
- C) Aus der Darlegung muss ersichtlich sein, inwieweit die zugänglichen Informationsmöglichkeiten (z. B. Literatur, Datenbanken) bereits hinreichende Erkenntnisse über das angestrebte Versuchsergebnis enthalten oder nicht. Die zu Ziff. 1.1.2 geforderten Literaturzitate sind auf einem Beiblatt unter Angabe des Titels und der Fundstelle aufzulisten. Hinsichtlich der Datenbankrecherchen sind die Schlüsselwörter anzugeben.
Bei der Literaturrecherche empfiehlt es sich, den „Leitfaden für die Durchführung von Informationsrecherchen im Rahmen des Genehmigungsverfahrens für Tierversuche“ der ZEBET zu verwenden und entsprechende Ausführungen im Antrag vorzunehmen.
- D) Doppelversuche sind Versuchsvorhaben, die in einem gleichen Zeitraum mit gleichen Methoden, an derselben Tierart und mit gleicher Zielsetzung durchgeführt werden (z. B. Ringversuche zur Validierung und Standardisierung). Wiederholungsversuche sind Versuchsvorhaben, die zur Überprüfung bereits hinreichend bekannter Versuchsergebnisse durchgeführt werden.
- E) Tierversuche sind im Hinblick auf die artspezifischen Fähigkeiten der verwendeten Tiere unter den Versuchseinwirkungen zu leiden auf das unerlässliche Maß zu beschränken. Versuche an Tieren, deren artspezifische Fähigkeiten unter den Versuchseinwirkungen zu leiden, stärker entwickelt sind, dürfen nur durchgeführt werden, soweit Tiere deren derartige Fähigkeit weniger stark entwickelt ist, für den verfolgten Zweck nicht ausreichen (§ 7 Abs. 2 Nr. 5 TierSchG).
Sofern genetisch veränderte Tiere verwendet oder genetisch veränderte Tierlinien generiert werden sollen, sind deren Eigenschaften und mögliche Belastungen zu beschreiben und zu bewerten (Formblätter „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ einreichen). Eine Hilfestellung bei der Belastungsbeurteilung gibt die Empfehlung „Festlegung von Kriterien zur Beurteilung der Belastung genetisch veränderter Versuchstiere“ (Link einfügen) sowie das Arbeitspapier zu genetisch veränderten Tieren auf EU-Ebene (deutsche Übersetzung mit Erläuterungen und Empfehlungen – (Link einfügen)).
Für bereits existente und ausreichend charakterisierte Linien können bereits erhobene Daten (z.B. Datenblätter der Züchter, eigene Untersuchungen) zur Belastungseinstufung herangezogen werden.
Für die Erstellung einer neuen genetisch veränderten Tierlinie oder bei unzureichend charakterisierten Linien ist die erwartete Belastung prospektiv einzuschätzen.

Ferner dürfen Wirbeltiere und Kopffüßer in Tierversuchen nur verwendet werden, wenn sie für einen solchen Zweck gezüchtet wurden. Eine Ausnahme hiervon kann dann zugelassen werden, wenn wissenschaftlich begründet dargelegt wird, dass die Verwendung von anderen Tieren erforderlich ist.

Für Pferde, Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen, Hühner, Tauben, Puten, Enten, Gänse und Fische (ausgenommen Zebrafische) ist eine Ausnahmegenehmigung nicht erforderlich.

Unter Berücksichtigung dieser grundsätzlichen Erwägungen ist das "Tiermodell" zu wählen, das versuchstechnisch gesehen eine möglichst optimale Beantwortung der Fragestellung erlaubt. Sind mehrere Tierarten oder Tiermodelle für die Beantwortung einer Fragestellung geeignet, müssen die Alternativen diskutiert und die endgültige Wahl begründet werden.)

F) Die Planung sollte unter Einsatz biometrischer Verfahren vorgenommen werden. Auf die Ergebnisse dieser Planung ist in der Begründung einzugehen. Zusätzlich sind Angaben über die Einteilung in Versuchsgruppen bzw. Kontrollgruppen sowie über die Gruppengrößen vorzunehmen. Die Darstellung der Versuchs- und Kontrollgruppen ist in übersichtlicher Form vorzunehmen, möglichst auch mit einer Tabelle. Die Gruppen sollten auch im Hinblick auf die Aufzeichnungen nach § 9 Abs. 5 TierSchG konkrete Bezeichnungen enthalten.

Hinsichtlich der Reservetiere ist klarzustellen, ob die Gruppengröße aufgrund wahrscheinlicher Ausfälle von Beginn an erhöht werden muss, um sicher auf eine bestimmte Fallzahl zu kommen oder ob es sich um echte Reserven handelt, die erst dann in den Versuch gehen, wenn tatsächlich Tiere ausgefallen sind. Die Unerlässlichkeit der Reservetiere ist wissenschaftlich begründet darzulegen.

Die einzelnen Teilversuche sind in übersichtlicher Form darzustellen, entweder mittels Tabellen mit begleitenden Erläuterungen oder über das Formblatt „Angaben zur biometrischen Planung“.

G) Als zu Versuchszwecken gezüchtet (§ 19 Abs. 1 Satz 1 TierSchVersV) sind nur Wirbeltiere und Kopffüßer anzusehen, die aus Versuchstierzuchten stammen, die für ihre Tätigkeit eine Erlaubnis nach § 11 Abs. 1 Nr. 1 TierSchG erhalten haben, oder nachweislich aus Versuchstierzuchten außerhalb des Geltungsbereiches des deutschen Tierschutzgesetzes stammen.

Bei der Verwendung von Versuchstieren aus Versuchstierzuchten außerhalb des Geltungsbereiches des Tierschutzgesetzes ist die Bestätigung der Anerkennung durch das Herkunftsland dem Genehmigungsantrag in Ablichtung beizufügen, sofern diese Zucht nach Kenntnis des Antragstellers der Genehmigungsbehörde nicht bekannt ist.

Bei der Verwendung von aus der Natur entnommenen Tieren und streunenden oder verwilderten Haustieren ist der Fangort anzugeben.

H) Für Pferde, Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen, Hühner, Tauben, Puten, Enten, Gänse und Fische (ausgenommen Zebrafische) ist eine Ausnahmegenehmigung nicht erforderlich.

Die erneute Verwendung eines Tieres in einem weiteren Versuchsvorhaben, für das auch ein zuvor noch nicht verwendetes Tier eingesetzt werden könnte, darf nur erfolgen, wenn

- 1.) das Tier zuvor nicht in einem Tierversuch verwendet worden ist, der als „schwer“ einzustufen ist,
- 2.) sein allgemeiner Gesundheitszustand und sein Wohlbefinden vollständig wiederhergestellt sind,
- 3.) das Tier im Rahmen des weiteren Versuchsvorhabens nicht in einem Tierversuch verwendet wird, der als „schwer“ einzustufen ist und

4.) die erneute Verwendung im Einklang mit einer tierärztlichen Empfehlung steht, die Art und Umfang der Schmerzen, Leiden und Schäden berücksichtigt, die das jeweilige Tier während seines gesamten bisherigen Lebenslaufes erfahren hat.

Ausnahmen davon können erteilt werden, wenn die Tiere nicht mehr als einmal in einem Tierversuch der Kategorie „schwer“ verwendet, sie tierärztlich untersucht wurden und im Rahmen des weiteren Versuchsvorhabens nicht in einem Tierversuch verwendet wird der als „schwer“ oder „mittel“ einzustufen ist. Das Ergebnis der tierärztlichen Untersuchung ist dem Antrag auf Ausnahmegenehmigung beizufügen.

I) Die Genehmigung kann für maximal 5 Jahre erteilt werden.
Anzeigen sind auf eine Dauer von maximal 5 Jahre begrenzt.

J) Es sind die Räumlichkeiten, evtl. vorhandene Hygieneschleusen, Barrièresysteme, Haltungssysteme, Klima, Art des Futters und Besatzdichte der Käfige, bezogen auf die jeweilige Tierart, zu beschreiben. Inwieweit ist sichergestellt, dass nur Tiere verwendet werden, für die eine latente Erkrankung, die den Ablauf des Experiments zu beeinträchtigen vermag, ausgeschlossen werden kann? Wie werden die Tiere auf den Versuch vorbereitet (Adaption an Haltungs- und Versuchsbedingungen, Handling, Habituation und Training)?

Erfolgt eine Hygieneüberwachung gemäß den FELASA-Richtlinien?

In welchen Intervallen werden welche Untersuchungen durchgeführt? Welche Untersuchungsmethode, welche Sentinelmethode wird gewählt? Wie groß ist die Anzahl der Tiere pro Einheit, die getestet wird? Welcher Sentinelstamm wird eingesetzt?
Eine Abweichung von den vorgeschriebenen Haltungsbedingungen ist versuchsspezifisch wissenschaftlich zu begründen.

- K) Die Durchführung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen sowie der Ablauf des Versuches sind genau zu beschreiben, wenn möglich anhand einer graphischen Darstellung, eines Fließschemas, eines Zeitbalkens oder einer Tabelle.
- L) Die Beurteilung der Belastung muss - sofern sich diese unterscheidet - für die einzelnen Versuchsgruppen getrennt vorgenommen werden. Dabei sind nachfolgende Kriterien besonders zu berücksichtigen:
Voraussichtliche Belastungen der Versuchstiere durch Manipulation, die mit Schmerzen und Leiden verbunden sind,
1. während der Versuchsvorbereitung (z. B. nüchtern halten)
2. ab dem Beginn von der Norm abweichender Haltungsbedingungen oder
3. ab dem Eingriff oder der Behandlung bis
4. zum Versuchsende oder bis
5. zum Erreichen eines Zustandes ohne Schmerzen, Leiden oder Schäden im Verlauf des Beobachtungszeitraums
6. nach dem Tierversuch bei Überleben.
Hierbei sind Grad, Dauer und Wesen der Belastung anzugeben und zu begründen.

Die Belastungsbewertung muss nachvollziehbar dokumentiert sein. Auch eine ggf. vorhandene Vorbelastung von z. B. genetisch veränderten Tieren ist zu würdigen.
Die Intensität der Belastung ist grundsätzlich entsprechend der voraussichtlichen Allgemeinzustände der Versuchstiere anhand eines **Score Sheets** (Überwachungsbögen) nach klinischen Befunden sowie nach den zu erwartenden Körpergewichts- und Verhaltensänderungen sowie Gesichtsausdrücken zu beurteilen. Es ist darauf zu achten, dass die Belastungseinschätzung des Versuches und die Maximalbelastung, die im Score Sheet zugelassen wird, übereinstimmen.

Versuchsabbruchkriterien sind konkret festzulegen. Die Belastungen sind bei unterschiedlicher Intensität in ihrem zeitlichen Verlauf nach Kriterien „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „gering“, „mittel“ oder „schwer“ zuzuordnen und in die beiliegende **Belastungstabelle** mit Quellenhinweis auf den verwendeten Belastungskatalog einzutragen.

(Die Belastungstabelle wird neu erstellt in Anlehnung an das EU-severity assessment
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Consensus%20doc%20on%20severity%20assessment.pdf)

„Score Sheets“ müssen versuchsspezifisch sein und die folgenden Punkte beinhalten:

1. Zu erwartende Belastungsanzeichen und deren Gewichtung und zu ergreifende Maßnahmen
2. Abbruchkriterien bzw. humane Endpunkte
3. Kritische Zeitpunkte für das Tier und den Versuch & dementsprechende Überwachungshäufigkeit
4. Spezielle Haltungs- und Pflegemaßnahmen
5. Möglichkeit der Protokollierung des Gewichts, spezifischer Maßnahmen etc.

Klare Handlungsanweisung für die mit der Pflege der Tiere betrauten Personen, welche ihnen erlaubt, ein Tier umgehend zu töten, wenn ein Abbruchkriterium erfüllt wird.

- M) Die Aufzeichnungen sind nach Versuchsende 5 Jahre aufzubewahren! Werden die Aufzeichnungen elektronisch erstellt, sind sie unverzüglich nach Abschluss jedes Teilversuchs des Versuchsvorhabens auszudrucken und von dem Leiter des Versuchsvorhabens oder seinem Stellvertreter zu unterzeichnen.
Die Aufzeichnungen nach § 9 Abs. 5 Satz 1 TierSchG i. V. m. § 29 TierSchVersV haben folgende Angaben zu enthalten (siehe auch Merkblatt „Aufzeichnungen“ des LAGESO Berlin):
- verfolgter Zweck
 - Tierart/Tierarten
 - Anzahl der Tiere
 - Art und Durchführung der Tierversuche
 - Namen der Personen, die die Tierversuche durchgeführt haben
- Bei der Verwendung von Wirbeltieren zusätzlich: Herkunft, Anschrift und Name des Vorbesitzers.

Bei Hunden, Katzen und Primaten zusätzlich: Geschlecht, eine an dem Tier vorgenommene Kennzeichnung nach § 9 TierSchVersV und bei Hunden und Katzen die Rasse anzugeben.

- N) In engem Bezug zu dem beantragten Versuchsvorhaben ist hier aus der Sicht der Wissenschaft darzulegen, in welchem Verhältnis Umfang und Schwere der möglichen Beeinträchtigungen bei den eingesetzten Tieren zu dem zu erwartenden wissenschaftlichen Fortschritt bzw. der Erkenntnismehrung stehen. Es muss dargelegt werden, dass das (menschliche) Interesse an dem angestrebten Erkenntnisgewinn und dem daraus resultierenden medizinischen oder sonstigen Nutzen **deutlich schwerer** wiegt als das (tierische) Interesse an der Vermeidung der mit dem Versuch verbundenen Schmerzen, Leiden oder Schäden.
- O) Als gleichartig sind Versuchsvorhaben mit derselben Frage und Methode anzusehen, bei denen an derselben Art und der etwa gleichen Anzahl der Versuchstiere Routineuntersuchungen mit dem gleichen Material durchgeführt werden. Die Zahl der im vorhergegangenen Kalenderjahr durchgeführten Versuchsvorhaben sowie Art und Zahl der insgesamt verwendeten Tiere sind der zuständigen Behörde bis zum 15. Februar eines Jahres anzugeben.
- P) Aufgrund der Verantwortung, die Leitung und Stellvertretung insbesondere hinsichtlich der Begrenzungen von zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden bei den Versuchstieren zu tragen haben, sind gehobene Ansprüche an deren fachliche Qualifikation zu stellen. Ärztinnen/Ärzte, Zahnärztinnen/Zahnärzte Tierärztinnen/Tierärzte sowie Naturwissenschaftlerinnen/Naturwissenschaftler erfüllen die Voraussetzungen, sofern sie sich in mindestens dreijähriger tierexperimenteller Tätigkeit unter kundiger Anleitung spezielle Fachkenntnisse angeeignet haben. Der Nachweis der fachlichen Eignung ist durch Vorlage der entsprechenden Dokumente zu erbringen:
- abgeschlossenes Hochschulstudium der Medizin, Zahnmedizin oder Veterinärmedizin;
 - durch ein **deutsches** Zeugnis über die tierärztliche, ärztliche oder zahnärztliche Prüfung oder
 - durch ein im Geltungsbereich des Tierschutzgesetzes als gleichwertig anerkanntes Prüfungszeugnis oder Diplom;
 - abgeschlossenes naturwissenschaftliches Hochschulstudium;
 - durch ein Diplom oder Zeugnis einer wissenschaftlichen Hochschule im Geltungsbereich des Tierschutzgesetzes oder
 - durch ein innerhalb des Geltungsbereiches des Tierschutzgesetzes als gleichwertig anerkanntes Diplom oder Zeugnis;
 - der Nachweis dreijähriger tierexperimenteller Tätigkeit kann durch eine Bestätigung der anleitenden Person, oder durch Teilnahmebescheinigungen an entsprechenden Fortbildungskursen erbracht werden.
- Q) Sofern der Ausbildungsnachweis in einem früheren Antrag gegenüber dieser Behörde erbracht wurde, genügt ein Hinweis auf diesen Antrag unter Angabe des Geschäftszeichens; die Nachweise der Ausbildung (Abschlusszeugnis, „Diplom“) sind in deutscher Sprache vorzulegen. Bei fremdsprachigen Zeugnissen ist die Genehmigungsbehörde berechtigt, eine deutsche Übersetzung durch einen öffentlich benannten und beeidigten Übersetzer – es genügt die Ablichtung des Originals – einzufordern.
- R) Die für die Durchführung von Tierversuchen erforderlichen Fachkenntnisse gemäß Anlage 1 Abschnitt 3 TierSchVersV werden i.d.R. durch geeignete Ausbildung und berufliche Erfahrung erworben. Die Anforderungen, die an diese Fachkenntnisse zu stellen sind, sind unterschiedlich und haben sich auf der Grundlage der Anlage 1 Abschnitt 3 TierSchVersV an der jeweils auszuführenden Tätigkeit zu orientieren.
- a. Bei Tierversuchen i. S. des § 7 Abs. 2 Satz 2 Nr. 1 TierSchG, die zur Herstellung, Gewinnung, Aufbewahrung oder Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen vorgenommen werden, sind keine speziellen beruflichen Voraussetzungen erforderlich. Erfahrungen im Umgang mit Versuchstieren der betreffenden Art sowie die sichere Beherrschung der erforderlichen Techniken werden als ausreichend angesehen.
 - b. Fachkenntnisse für Behandlungen und nichtoperative Eingriffe an Wirbeltieren und Kopffüßern können bei Personen mit abgeschlossenem Hochschulstudium der Veterinärmedizin, der Medizin oder der Zahnmedizin vorausgesetzt werden, sofern sie sich zusätzlich auf Grund einer ausreichenden Anleitung

in tierexperimentellen Techniken oder versuchstierkundlichen Kursen die speziellen für dieses Vorhaben nötigen Kenntnisse erworben haben. Dies gilt ebenso für Personen, die ein naturwissenschaftliches Studium abgeschlossen haben und nachweislich die erforderlichen Kenntnisse und Fähigkeiten besitzen, sowie für Personen, die nachweislich aufgrund einer abgeschlossenen Berufsausbildung die erforderlichen Kenntnisse und Fähigkeiten haben. Die Anleitung in tierexperimentellen Techniken sollte i. d. R. in speziellen versuchstierkundlichen Kursen und/oder Ausbildungsvorhaben nach § 8a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG erfolgen.

- c. Für operative Eingriffe an Wirbeltieren und Kopffüßern können die erforderlichen Fachkenntnisse grundsätzlich vorausgesetzt werden bei Veterinärmedizinerinnen/Veterinärmedizinern und Medizinerinnen/Medizinern, sofern sie sich zusätzlich auf Grund einer ausreichenden Anleitung in tierexperimentellen Techniken oder versuchstierkundlichen Kursen die speziellen für dieses Vorhaben nötigen Kenntnisse erworben haben. Dies gilt ebenso für Absolventen eines naturwissenschaftlichen Hochschulstudiums, die nachweislich die erforderlichen Kenntnisse und Fähigkeiten haben.

Für Personen, die die vorgenannten Bedingungen hinsichtlich der Ausbildung nicht erfüllen (z. B. technische Assistentinnen/Assistenten, Doktorandinnen/Doktoranden, Diplomandinnen/Diplomanden usw.), ist in jedem Falle eine Ausnahmegenehmigung nach § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV zu beantragen. Die Ausnahmegenehmigung kann nur erteilt werden, wenn die entsprechenden Fachkenntnisse nachgewiesen werden. Wurde bereits in früheren Genehmigungsbescheiden eine Sondergenehmigung erteilt, ist dies unter Angabe des Aktenzeichens zu vermerken.

Als operative Eingriffe gelten alle instrumentellen Einwirkungen, bei denen die Haut oder darunterliegendes Gewebe eines lebenden Tieres mehr als punktförmig durchtrennt wird.

Ggf. sind für die Angaben zu den einzelnen Personen die Personenbögen gem. Anlage 9 zu verwenden. Für die Nachmeldung von Personen in bereits genehmigten Tierversuchsanträgen sind die Personenbögen in jedem Fall zu verwenden.

- S) Je nach Ausbildungsstand ist von den Auszubildenden eine Ablichtung der Immatrikulationsbescheinigung, des Ausbildungsvertrags, des Zwischenzeugnisses, des Berufsabschlusszeugnisses, des Studienabschlusszeugnisses oder der Approbationsurkunde o. Ä. beizufügen.
- T) Die Betäubung von Wirbeltieren darf gem. § 17 Abs. 2 Satz 3 TierSchVersV nur durch Personen mit abgeschlossenes Hochschulstudium der Veterinärmedizin, Medizin oder der Zahnmedizin erfolgen. Dies gilt auch für Personen mit abgeschlossenem naturwissenschaftlichem Hochschulstudium, die nachweislich die erforderlichen Kenntnisse und Fähigkeiten haben oder für Personen, die aufgrund einer abgeschlossenen Berufsausbildung nachweislich die erforderlichen Kenntnisse und Fähigkeiten besitzen. Soweit die Durchführung der Betäubung Ausbildungs-, Fortbildungs- oder Weiterbildungszwecken dient, kann diese auch unter Aufsicht einer solchen Person vorgenommen werden.
- U) Sofern der Antragsteller nicht ausdrücklich auf die Anonymisierung verzichtet, sind in den zu genehmigenden Antragsexemplaren für die Kommission die Hinweise auf den Antragsteller unkenntlich zu machen.
- V) Die Unterschrift des Tierschutzbeauftragten zur Kenntnisnahme dient der Herstellung der Kongruenz des Antrags bzw. der Anzeige mit der Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten.



Charité | Virchowweg 6 | 10117 Berlin
LaGeSo
z. Hd. Frau Ullrich

Institut für Physiologie
Charité Cross Over, Virchowweg 6
Campus Charité Mitte
Charité Universitätsmedizin

Dr. Jana Grune
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Tel.: 030-450 528 574
jana.grune@charite.de

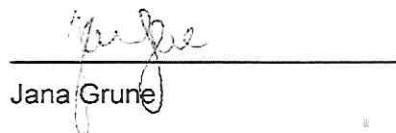
28.06.2018

Änderungsanzeige G 0030/18

Sehr geehrte Frau Ullrich,

anhängig finden sie eine Änderungsanzeige für das Tierversuchsvorhaben G 0030/18
mit der Bitte um Freigabe und Genehmigung. Vielen herzlichen Dank!

Mit freundlichen Grüßen



Jana Grune

An das
Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
IC 1
Postfach 31 09 29
10639 Berlin

Tierschutzbeauftragte/r:

Änderung eines Tierversuchsvorhabens

- Änderung zum genehmigten Tierversuchsvorhaben Reg-Nr: 0030/ 18
nach § 34 TierSchVersV
- Änderung zur Anzeige Reg-Nr: / nach § 37 TierSchVersV

Dieses Formular ist ausschließlich für die Beantragung/Anzeige inhaltlicher Änderungen vorgesehen. Verlängerungen und personelle Änderungen sind anhand der entsprechenden Formblätter zu beantragen/anzuzeigen.

1. Die Änderung wird seitens des/r Antragsstellers/in eingestuft als

- anzeigepflichtig gemäß § 34 Abs. 1 TierSchVersV
- genehmigungspflichtig gemäß § 34 Abs. 3 TierSchVersV
ggf. neue NTP-ID:

(die endgültige Entscheidung hierüber obliegt der Behörde).

2. Bezeichnung des Versuchsvorhabens

Titel des Antrags bzw. der Anzeige

Vaskuläres Remodeling bei pulmonaler Hypertonie Typ 2

3. Zweck, Unerlässlichkeit und Diskussion der ethischen Vertretbarkeit der Änderung

Bitte schildern Sie hier kurz Ihre bereits erzielten Ergebnisse. Welche Erkenntnisse führen zu dieser Änderung? Erläutern Sie den erhofften Mehrwert und formulieren Sie eine Forschungshypothese zur Änderung.

Das suprakoronare Aortenbanding wurde von uns im Rahmen des Tierversuchsvorhabens G0030/18 zunächst an 5 Tieren nach Protokoll durchgeführt. Die Operation führte zu einer erhöhten inter- und postoperativen Mortalitätsrate bei allen 5 Tieren innerhalb von wenigen Stunden. Die erhöhte Mortalität ist unseres Erachtens nach auf eine unzureichende Lungenventilation zurückzuführen (Symptome: Luftnot, Schnappatmung), die durch eine Atemmaske kontrolliert werden sollte. Aufgrund dieser Vorkommnisse wurden weitere Operationsvorhaben von uns eingestellt und eine umfangreiche Literaturrecherche zum Thema Ventilationsstörungen bei mikrochirurgischen Aortenbanding-Operationen durchgeführt.

Mehrere etablierte Protokolle empfehlen zur Stabilisierung der Beatmung vor dem Eröffnen des Thorax eine Tracheotomie (Lufröhrenschnitt) zur Intubation des Tieres (1,2,3). Die Tracheotomie vor dem suprakoronaren Aortenbanding ermöglicht einen sicheren Zugang zu den Atemwegen und eine kontrollierte und hinreichende Ventilation während des Experiments. Die kontrollierte Lungenventilation verbessert die postoperative Erholung des Einzel-

tieres und erhöht die Überlebenswahrscheinlichkeit und -rate der Tiere, sodass wir abweichend vom beantragten Protokoll gern die Tracheotomie im genannten Versuchsvorhaben zusätzlich zur Gewährleistung einer ausreichenden Ventilation anwenden würden.

4. Ausschöpfung zugänglicher Informationsmöglichkeiten

Ist das durch die Änderungen angestrebte Versuchsergebnis noch nicht hinreichend bekannt? Welche Informationsmöglichkeiten haben Sie genutzt? Sie können sich dabei an dem „Merkblatt Datenbankprotokoll“ orientieren.

Für die Literaturrecherche wurden vor allem die Datenbanken Pubmed und Medline verwendet und die untenstehenden Publikationen als relevant identifiziert. Zusätzlich haben wir mit Kooperationspartnern aus Kanada Kontakt aufgenommen, die ein Banding-Protokoll mit Tracheotomie und Intubation als gut etablierteres Standardverfahren einsetzen und damit geringe Mortalitätsraten erzielen (<10%).

Auch die eigentliche Operation während der das Aortenbanding durchgeführt wird, wird in den untenstehenden Referenzen nach einem leicht modifizierten Protokoll des suprakoronaren Aortenbandings, bei dem Länge der Inzision und Rippenspreizung vom von uns ursprünglich beantragten Protokoll abweichen, durchgeführt. Eine in diesen Publikationen empfohlene Inzision von ca. 2 cm ermöglicht dem Operateur größeren Handlungsspielraum und mehr Bewegungsfreiheit während der Operation, so dass das Banding schneller durchgeführt werden kann (2, 3). Dies verkürzt vor allem die Zeit unter Narkose für das Tier und leitet früher die Regenerationsphase post-operativ ein. Deshalb möchten wir gern dieses modifizierte Verfahren zur Durchführung des suprakoronaren Aortenbandings im vorliegenden Versuchsvorhaben anwenden (Details zur Durchführung unter Punkt 5).

Referenzen:

1. Ghali MGZ (2018) Microsurgical technique for tracheostomy in the rat. *MethodsX* 5: 61-67
2. Gs AK, Raj B, Santhosh KS, Sanjay G, Kartha CC (2014) Ascending aortic constriction in rats for creation of pressure overload cardiac hypertrophy model. *J Vis Exp*: e50983
3. Santhosh Kumar Sankaran, Ajith Kumar, G.S, Binil Raj, S.S and Rajagopal (2014) Two different rat models for cardiac hypertrophy by constriction of ascending and abdominal aorta. *Journal of Laboratory Animal Science* 54-57

5. Inhaltliche Beschreibung der beabsichtigten Änderung

Bitte beschreiben Sie genau, wie die geplante Änderung durchgeführt werden soll.

Beschreibung des Tracheotomie-Verfahrens:

Vor dem eigentlichen suprakoronaren Aortenbanding wird eine ventrale zervikale Mittellinien-Inzision (ca. 7 mm) vom Manubrium sterni bis zur Höhe des Halsknochens durchgeführt. Durch die Dissektion des zervikalen Weichgewebes werden die Muskeln freigelegt, die in der Mittellinie gespalten und seitlich zurückgezogen werden, um die Trachea freizulegen. Es wird eine Mittellinieninzision der Trachea zwischen 2 knorpeligen Trachealringen vorgenommen. Eine Trachealkanüle wird in die Luftröhre eingeführt, gesichert und an ein mechanisches Ventilationssystem angeschlossen. Das Lüftungssystem ermöglicht die Kontrolle des Luftvolumens und des Drucks.

Nach der Tracheotomie wird das eigentliche suprakoronare Aortenbanding durchgeführt. Der linksthorakale Hautschnitt wird ausgehend vom 2. Interkostalraum links auf einer Länge von ca. 20 mm eröffnet. Die Rippen werden zurückgezogen, um den aufsteigenden Ast des

Aortenbogens zu lokalisieren. Die leichtere Visualisierung der Aorta ascendens ermöglicht den zügigen Einsatz eines Titan-Clips mit einem definierten Innendurchmesser von 0,8 mm (wie ursprünglich benannt). Der Clip wird, wie im ursprünglichen Protokoll beantragt, um die Aorta ascendens direkt hinter dem Aortenbulbus gelegt und fixiert. Schließlich wird die Brustwand in 2 Schichten durch eine Einzelknopfnaht verschlossen. Die Rippen und Muskelschichten sowie die Hautschnitte werden mit einer fortlaufenden Naht verbunden. Nach der OP wird die Trachealkanüle entfernt und die Wiederherstellung der Spontanatmung überwacht. Sobald die Spontanatmung wieder hergestellt ist, wird die Trachealöffnung ebenfalls durch eine Naht verschlossen (Einzelstiche an proximalen Knorpelringen und Muskelschichten und fortlaufende Stiche zum Schließen der Hautinzisionen).

Aufgrund der zunehmenden Invasivität des modifizierten Protokolls wird auch die postoperative Versorgung verbessert, um die Belastung der Tiere zu verringern und die Genesung zu fördern. (1) Der Operationsbereich wird mit Povidon-Iod-Lösung desinfiziert, um Infektionen in den oberen Atemwegen zu vermeiden. (2) Als postoperative Analgesie wird Carprofen (5 mg/kg/Tag) intraperitoneal während 1 Woche injiziert (ursprünglich nur 5 Tage lang benannt). (3) Amoxycillin (Dosis: 500 mg/L) wird 1 Woche lang über das Trinkwasser gegeben um eine ausreichende Antibiose der Tiere zu gewährleisten.

6. Angaben zu den für die Verwendung vorgesehenen Versuchstieren

(Tierzahl, Art, Stamm, Geschlecht, Alter, Herkunft, - wenn abweichend vom Originalantrag)

Tierart*	Ratte
1) Anzahl bisher genehmigter Tiere	1800
2) Anzahl zusätzlich beantragter Tiere	-
3) ggf. Tierzahl entfallender Versuchsgruppen**	-
4) Differenz aus 2) & 3)	-
5) resultierende neue Gesamtzahl	-

* bei mehrere Spezies betreffenden Änderungen bitte zusätzliche Spalten einfügen

** bei entfallenden Versuchsgruppen unter Ziffer 5 Gruppen-/Teilversuchs-Nr. eindeutig angeben

Erläuterung mit Begründung:

Wir beantragen keine zusätzlichen Tiere im genannten Versuchsvorhaben.

7. Angabe, welche Belastungen für die Tiere durch die Änderung entstehen

unverändert

erhöht

verringert

Begründung:

Die Belastung der Tiere ist aus unserer Sicht als "Unverändert" einzustufen. Die zusätzliche OP-Narbe im Halsbereich birgt zwar ein geringes zusätzliches Risiko für Infektionen, allerdings gewährleistet die kontrollierte und steuerbare Lungenventilation während der Operation eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere und trägt damit erheblich zur postoperativen Erholung der Tiere bei. In Kombination mit einer optimierten postoperativen Versorgung führt dies zu einer gleichbleibenden Belastung und reduziert die Mortalitätsrate im genannten Versuchsvorhaben.

8. Ort der Versuchstierhaltung und Ort der Versuchsdurchführung

Änderungen: Ja Nein

Welche:

Information über die Datenverarbeitung

Hiermit informieren wir Sie, welche personenbezogenen Daten wir von Ihnen erheben, wofür diese benötigt werden und wie sie bei uns verarbeitet werden. Außerdem informieren wir Sie über Ihre Rechte nach geltendem Datenschutzrecht.

Die Datenverarbeitung erfolgt zum Zweck der Antragsbearbeitung, der Kontrolle/Überwachung/ Erfassung, zu Archiv- und Statistikzwecken und zur Effektivierung des Verwaltungshandelns. Hierzu werden Ihr Name, Geschlecht, Geburtsdatum, berufliche Anschrift, Beruf, Qualifikation und versuchstierkundliche Sachkunde sowie das Aktenzeichen zu Ihrem Vorgang gespeichert. Um ggf. Gebühren erheben zu können erfolgt eine Übermittlung Ihres Namens und Ihrer Anschrift an das Haushaltsreferat innerhalb des LAGeSo.

Genehmigungspflichtige Tiersuchsanträge werden bei der Tierversuchskommission vorgelegt, soweit von Ihnen gewünscht in anonymisierter Form. Diese Einwilligung zur Weitergabe Ihrer Daten kann von Ihnen jederzeit widerrufen werden.

Rechtliche Grundlage ist § 16 Abs. 6 Tierschutzgesetz bzw. § 3 Bundesdatenschutzgesetz vom 30.6.2017.

Ihre personenbezogenen Daten werden bei uns sowohl in Papierform als auch elektronisch gespeichert. Der Zeitpunkt der Löschung der elektronischen Akten bzw. Vernichtung der Akten orientiert sich an verwaltungsrechtlichen Dokumentationspflichten und variiert zwischen ein und zehn Jahren.

Als von der Datenverarbeitung betroffene Person haben Sie folgende Rechte:

1. Sie können bei uns Auskunft darüber verlangen, welche personenbezogenen Daten wir über Sie zu welchen Zwecken verarbeiten und wem diese bereits offengelegt oder an wen diese weitergeben wurden. Auch an wen wir Sie noch weiter geben wollen ist Bestandteil der Auskunft.
2. Sie können bei uns die Berichtigung fehlerhafter Angaben zu Ihrer Person verlangen.
3. Sie können die Löschung Ihrer Daten verlangen, z.B. wenn Sie Ihre Einwilligung widerrufen/die Daten bei uns für den oben angegebenen Zweck nicht mehr benötigt werden und es auch keine gesetzliche Grundlage mehr für die längere Speicherung bei uns gibt.
4. Unter bestimmten Umständen können Sie die Einschränkung der Verarbeitung Ihrer Daten bei uns verlangen; die Daten werden dann nicht gelöscht, aber nicht weiter genutzt.
5. Aus Gründen, die sich auf Ihrer besonderen persönlichen Situation ergeben, können Sie gegen die Verarbeitung ihrer personenbezogenen Daten Widerspruch einlegen.
6. Sie haben das Recht, nicht einer auf ausschließlich automatisierter Datenverarbeitung beruhender Entscheidung (Profiling) unterworfen zu werden.
7. Wenn Sie nicht zufrieden mit der Datenverarbeitung bei uns sind, können Sie auch bei der zuständigen Aufsichtsbehörde (Berliner Beauftragte für Datenschutz und Informationsfreiheit, Friedrichstr. 219, 10969 Berlin, mailbox@datenschutz-berlin.de) Beschwerde einreichen.

Für die Datenverarbeitung verantwortliche Stelle:

Landesamt für Gesundheit und Soziales LAGeSo

Ansprechpartner:

IC 1

Tel.: 90229 - 2401

Mail: johanna.hoessler@lageso.berlin.de

Datenschutzbeauftragter:

ZSL DSB

Tel.: 90229-1209

Mail: Datenschutz@lageso.berlin.de

23.06.2018

Ort und Datum

Unterschrift Antragsteller/in



Vermerk Tierschutzbeauftragte/r:

Impressum:

Landesamt für Gesundheit und Soziales, Turmstr. 21, 10559 Berlin

Rückfragen: Frau Johanna Hößler Tel. 90229-2401

E-mail: johanna.hoessler@lageso.berlin.de

Für den Inhalt verantwortlich: I C 1

V.i.S.d.P. Silvia Kostner

Stand: 05/ 2018