

		Inventaris Wob-verzoek W17-11								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20171824	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Origineel aanvraagformulier				x		x		
2		NTS initieel			x					
3		Projectvoorstel				x	x	x	x	
4		Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x	
5		DEC-advies				x		x		
6		Ontvangstbevestiging				x		x		
7		Verzoek om aanvullende informatie				x		x		
8		Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x		
9		NTS aangepast	x							
10		Adviesnota CCD		x						x
11		Beschikking en vergunning				x		x		

1824

23 MEI 2017



Centrale Commissie Dierproeven

1.

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	1179037
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
		Postbus	
		Postcode en plaats	9713 AV Groningen
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] ☐ Dhr. ☒ Mw.
		Functie	PhD kandidaat
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] ☒ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	Universitair docent
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="width: 50%; text-align: right;">☐ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres	
(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.										
Functie											
Afdeling											
Telefoonnummer											
E-mailadres											
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag</td> </tr> <tr> <td>☒ Nee</td> </tr> </table>	☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag	☒ Nee								
☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag											
☒ Nee											

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3</td> </tr> <tr> <td> ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 </td> </tr> <tr> <td> ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 </td> </tr> </table>	☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3	☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2	☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3				
☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2				
☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3				
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier</td> </tr> <tr> <td>☐ Nee > Ga verder met vraag 3</td> </tr> </table>	☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier	☐ Nee > Ga verder met vraag 3	
☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier				
☐ Nee > Ga verder met vraag 3				
2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>☐ Nee > Ga verder met vraag 3</td> </tr> <tr> <td>☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6</td> </tr> <tr> <td style="height: 50px;"></td> </tr> </table>	☐ Nee > Ga verder met vraag 3	☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6	
☐ Nee > Ga verder met vraag 3				
☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6				

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Startdatum</td> <td style="width: 50%;">15 - 06 - 2017</td> </tr> <tr> <td>Einddatum</td> <td>15 - 06 - 2022</td> </tr> </table>	Startdatum	15 - 06 - 2017	Einddatum	15 - 06 - 2022		
Startdatum	15 - 06 - 2017						
Einddatum	15 - 06 - 2022						
3.2 Wat is de titel van het project?	The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring						
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het effect van preeclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn						
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam DEC</td> <td style="width: 50%;">DEC-RuG</td> </tr> <tr> <td>Postadres</td> <td>A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>secredec.umcg@umcg.nl</td> </tr> </table>	Naam DEC	DEC-RuG	Postadres	A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen	E-mailadres	secredec.umcg@umcg.nl
Naam DEC	DEC-RuG						
Postadres	A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen						
E-mailadres	secredec.umcg@umcg.nl						

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1035 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

☐

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

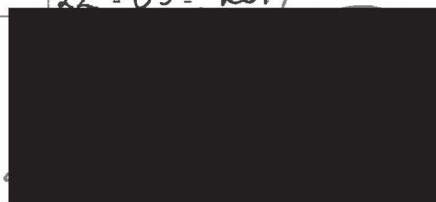
Plaats

Groningen

Datum

22 - 05 - 2017

Handtekening





Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het effect van pre-eclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn in muizen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Pre-eclampsie; foetale programmering; stofwisseling; cardiovasculaire gezondheid

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	☒ Fundamenteel onderzoek
	☒ Translationeel of toegepast onderzoek
	☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	☐ Hoger onderwijs of opleiding
	☐ Forensisch onderzoek
	☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Het doel van dit project is om te achterhalen wat de langetermijngevolgen van pre-eclampsie zijn voor moeder en nageslacht. Pre-eclampsie, ook wel zwangerschapsvergiftiging genoemd, is een gevaarlijke aandoening. Klinische symptomen zijn een hoge bloeddruk en eiwitten in de urine. De oorzaak is niet bekend. Wel is bekend dat de werking van de placenta verminderd is, waardoor de foetus minder voedingsstoffen binnen krijgt en vaak groeivertraging oploopt. Uit epidemiologische studies is bekend dat kinderen die als foetus zijn blootgesteld aan pre-eclampsie later een verhoogd risico hebben op hart- en
---	---

vaatziekten en problemen met de stofwisseling. Hoe dat precies komt, is niet duidelijk, maar het is heel goed mogelijk dat deze kinderen 'foetaal geprogrammeerd' worden voor een leven met weinig voedingsstoffen. Vervolgens kunnen ze de grote hoeveelheden vet, suiker en calorieën die er in onze westerse wereld beschikbaar zijn, niet verwerken.

Ook is bekend dat de moeder een verhoogd risico loopt op hart- en vaatproblemen na een zwangerschap met pre-eclampsie.

Pre-eclampsie is een ziekte die alleen spontaan voorkomt bij mensen. In proefdieren kunnen de symptomen op verschillende manieren nagebootst worden, maar geen van deze manieren leidt tot een 100% imitatie van humane pre-eclampsie.

In dit onderzoek willen we eerst vier verschillende diermodellen voor pre-eclampsie met elkaar vergelijken. Dit zal ons inzicht geven in de overeenkomsten en verschillen tussen de modellen onderling en tussen de diermodellen en humane pre-eclampsie.

Daarna volgen twee studies naar langetermijneffecten. In de eerste geven we het nageslacht verschillende diëten die relevant zijn voor onze eigen leefomgeving, zoals een dieet hoog in vet of suiker. De verwachting is dat dit leidt tot problemen met de stofwisseling, zoals diabetes. In de tweede zullen we nadelige gezondheidseffecten voor het nageslacht proberen te beperken door het dieet van de moeder aan te vullen met voedingssupplementen.

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

Met een diermodel is het mogelijk om tot op moleculair niveau te analyseren wat de langetermijneffecten op de gezondheid van moeder en kind zijn. Dit is de hoofdobbrengst van deze studie.

Daarnaast is de uitgebreide karakterisatie en vergelijking van vier verschillende muismodellen nuttig voor vele vervolgonderzoeken.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen. Het verwachte totale aantal is 2006, waarvan 363 vrouwtjes, 35 mannetjes en 1608 pups.

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

In alle studies zal in de moeders pre-eclampsie opgewekt worden. In onze huidige studie lijken de moeders van de symptomen van pre-eclampsie zelf geen ongerief te ervaren.

In de eerste studie moeten de moeders voor het verzamelen van urine één dag in een kooi verblijven met een rooster als ondergrond. De pups worden aan het einde van de zwangerschap geëuthanaseerd.

In de langetermijnstudies zullen de moeders tijdens de zwangerschap voedingssupplementen of medicatie toegediend krijgen en daarna een dieet dat bijvoorbeeld hoog is in zout of vet. Het is niet waarschijnlijk dat deze diëten ongerief veroorzaken. Het nageslacht krijgt na de spening een dieet dat bijvoorbeeld hoog is in vet of suiker. Om hun gezondheid gedurende lange tijd (maximaal 6 maanden) te karakteriseren is een aantal testen en bloedafname nodig. Soms zal individuele huisvesting tijdelijk nodig zijn.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het

Tijdens deze studies is het ongerief voor de moeders ingeschaald als 'matig' en dat voor het nageslacht als 'licht'.

project ingedeeld naar de verwachte ernst?

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De moeders en het nageslacht worden geëuthanaseerd om bloed en organen te analyseren. De mannetjes kunnen gebruikt worden voor andere onderzoeken of onderwijs.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Foetale programmering is het resultaat van een complexe interactie tussen moeder en foetus via de placenta. Dit kan op dit moment nog niet nagebootst worden.

4.2 **Vermindering**

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

Het ervaren van stress kan een grote variatie tussen individuen opleveren. Door stress te minimaliseren wordt deze variatie beperkt, waardoor minder dieren nodig zijn.

We zullen verscheidene experimenten tegelijk uitvoeren, zodat maar één controlegroep nodig is voor alle groepen.

We vragen 50% extra vrouwtjes aan om de muizen te vervangen die niet zwanger worden of die een extreem groot of klein nest krijgen. Als het niet nodig is, zullen we deze vrouwtjes niet gebruiken.

4.3 **Verfijning**

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

Waar mogelijk is bij het ontwerpen van onze studies de minst stressvolle optie gekozen. Een voorbeeld is de duur van de langetermijnstudie. Er staan testen gepland als de muizen 3 en 6 maanden oud zijn, maar als daar na 3 maanden geen reden toe is, zullen we de studie niet voortzetten.

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

De muizen worden constant gemonitord op overmatig gewichtsverlies en onnatuurlijk gedrag. Bij overmatige stress en angst wordt het dier geëuthanaseerd om verder ongerief te voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- ☒ Basic research
- ☒ Translational or applied research
- ☐ Regulatory use or routine production
- ☐ Research into environmental protection in the interest of human or
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries
- ☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Preeclampsia (PE) is a common complication during pregnancy, affecting 2-8% of all pregnancies. Clinically, it is characterized by maternal hypertension and proteinuria and often complicated by fetal growth restriction. The exact chain of events leading to PE is unclear. A main current hypothesis is that

the cause of PE is disturbed development of the placenta, by dysfunctional cytotrophoblast migration and invasion into the uterus, which leads to placental ischemia. Because of this ischemia, placental signalling factors are released into the mother's blood stream. Those factors include sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1; anti-angiogenic), sENG (soluble endoglin; anti-angiogenic) TNF- α (tumor necrosis factor alpha; pro-inflammatory) and AT1-AA (angiotensin II type I receptor autoantibodies; reduces NO levels, induces vasoconstriction and reactive oxygen species) (Spradley et al. 2015). Together, these factors cause endothelial dysfunction and thereby hypertension. Currently, there is no cure to PE other than delivery of the baby and placenta.

Research in human patients and their offspring has shown that PE poses a threat to both short-term and long-term maternal and fetal health (Steegers et al. 2010; Stojanovska et al. 2016). This project will focus on unravelling the molecular long-term consequences of PE on maternal and fetal health and on possible interventions.

Placental nutrient transport in PE - One of the main characteristics of PE is disturbed development of the placenta. Because of disturbed placentation, the offspring of preeclamptic mothers is challenged with a disturbed nutrient supply. This leads to compensatory mechanisms in the fetus, which sometimes achieve normal growth. More often, however, PE leads to intra-uterine growth restriction of the fetus (IUGR), which is a well-known risk factor for the development of metabolic syndrome later in life (Rando & Simmons 2015). Besides exposure to maternal high blood pressure and nutrient restriction, levels of several circulation factors, including reactive oxygen species, leptin, pro-inflammatory (TNF- α) and anti-angiogenic (sFlt1, sEng) factors, are found increased not only in the preeclamptic woman, but also in the cord blood of her child. Exposure to this wide range of alterations during development is likely to influence long-term programming of offspring's health after PE.

Long-term consequences - Thus, in PE, a combination of fetal undernutrition (by placental dysfunction), maternal hypertension and aberrant circulating factors in cord blood poses a special risk to the offspring. At school age, children exposed to PE have a higher blood pressure and heart rate, smaller hearts and other features of cardiac diastolic dysfunction. In the first five years of their lives, children exposed to PE are more often hospitalized for endocrine and metabolic diseases than non-exposed children, and in adolescence, BMI is higher in exposed males. Furthermore, PE exposure combined with insulin resistance is a strong predictor for the metabolic syndrome in school-age children (reviewed by Stojanovska et al, 2016). Concerning the mechanisms and determining factors involved in this programming of long-term health by PE, little is known. Cellular adaptations and epigenetic changes are likely to be important consequences of PE that can program long-term health. At the moment, interventions or a personal dietary advice for mothers and offspring exposed to PE are not possible.

Concerning the long-term health consequences for the mother, it is known that gestational hypertension and PE are associated with an increased risk for cardiovascular diseases (including chronic hypertension, ischemic heart disease and cerebrovascular accidents) later in life (Steeegers et al. 2010). Again, little is known about mechanisms and determining factors. It is not known if these women are at risk for cardiovascular diseases because of the events during PE or because of pre-existing factors that are involved in the onset of PE.

Obesity - Living in this westernized world, where obesity is common, poses another risk for direct and long-term consequences of PE. Prepregnancy obesity is a well-known risk factor for PE and is known to exaggerate both the PE phenotype in the dam and long-term metabolic consequences for the offspring (Bytautiene et al. 2011).

Prevention - For long-term fetal outcome, the main problem seems to be the limited placental transport capacity in PE. Ideally, one would aim to use the remaining capacity as efficient as possible for the transport of the most important nutrients. During pregnancy, supplementing the dietary factors that are scarce in the PE-exposed fetus or the factors that counteract on those too abundantly available in the dam and fetus are possibly beneficial for long-term health. Based on literature, candidates for supplementation are [REDACTED]

Furthermore, since DNA methylation changes are found in IUGR offspring, supplementing the one-carbon

pathway, which provides metabolites for DNA methylation, can show if this programming is a well-regulated adaptation to the changed environment *in utero*, or a maladaptation caused by shortage of nutrients because of placental insufficiency. It is already shown that this kind of supplementation abrogates metabolic consequences of IUGR in rats (Goodspeed et al. 2015).

PE animal models – Since PE is a pregnancy complication with unknown etiology, which only develops spontaneously in humans and higher primates, a perfect animal model does not exist yet. Opportunities for inducing PE in animals are in mimicking the clinical symptoms, which can be done in several ways.

Another promising model for PE is described by [redacted], where inhibition of [redacted] and thereby in an increase in blood pressure and proteinuria and a decrease in placental and fetal weight [redacted]. Furthermore, [redacted] are promising in modelling PE symptoms in animals. [redacted] are mediating the release of [redacted] and increased blood pressure [redacted]. And lastly, a murine knock-out model of the transcription factor Tfap2c leads to placental insufficiency and IUGR [redacted] however, the consequences for maternal blood pressure and proteinuria are not yet known. Since all of these models target different pathways in PE, an extensive comparison of the models is necessary to determine which model is best for translational studies.

Gains of this project – Most importantly, this study will shed light on the mechanisms playing a role in mediating the long-term health risk for children and mothers exposed to preeclampsia. By using an animal model, we are able to analyse molecular (gene expression and epigenetic) changes in several organs. In general, this study will give us fundamental insight into fetal programming. By testing consequences of and interventions to this extreme *in utero* situation, developmental mechanisms and fetal pathways that are vulnerable for fetal programming can be determined. This will lead to a better knowledge of which conditions during early life are ideal with respect to long-term health, also in uncomplicated pregnancies. Finally, our extensive comparison of animal models for preeclampsia will be useful for many future translational studies.

References

- [redacted]
- Bytautiene, E. et al., 2011. Prepregnancy obesity and sFlt1-induced preeclampsia in mice: developmental programming model of metabolic syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204, p.398.e1-8.
- Goodspeed, D. et al., 2015. Essential nutrient supplementation prevents heritable metabolic disease in multigenerational intrauterine growth-restricted rats. *FASEB Journal*, 29, pp.807–819.
- [redacted]
- Paauw, N.D. et al., 2017. Pregnancy as a critical window for blood pressure regulation in mother and child: Programming and reprogramming. *Acta Physiologica*, 219(1), pp.241–259.
- Rando, O.J. & Simmons, R.A., 2015. I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell*, 161(1), pp.93–105.
- Spradley, F.T., Palei, A.C. & Granger, J.P., 2015. Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. *Am J physiol regul integr comp physiol*, 309, pp.R1326–R1343.
- Steegers, E.A.P. et al., 2010. Pre-eclampsia. *The Lancet*, 376(376), pp.631–644.
- Stojanovska, V., Scherjon, S.A. & Plösch, T., 2016. Preeclampsia as modulator of offspring health. *Biology of Reproduction*, 94(3), pp.1–33.
- [redacted]

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main goal of this research is to unravel the long-term molecular consequences of preeclampsia for both mother and offspring in a mouse model. To that end, we have three sub-goals:

1. to characterize and compare four different mouse models of PE, all representing different facets of the disease.
2. to examine the long-term consequences of PE on maternal and offspring health, while both offspring and mother are placed on a diet relevant for this western world.
3. to examine possible interventions that can prevent the adverse programming of later-life health during pregnancy.

Achievability: from epidemiological studies, it is known that long-term health of offspring and dams is affected during PE, but to which extent and what the mechanisms are is not known yet. In mice with little intra-individual variability, most confounding factors are ruled out, which makes it possible to examine the precise consequences and the mechanisms playing a role. The use of animals makes it possible to take out and examine different organs. C57BL/6 mice are the perfect organism to study this question, because they are able to develop metabolic problems in a relatively short time span. Our pilot study already showed that we are able to mimic at least a part of the symptoms of clinical PE in mice with [REDACTED]. The [REDACTED] are used by other groups, but not fully characterized for PE yet. Placentas of the [REDACTED] are known to have a compromised junctional zone, which is also seen in PE, but this model is not characterized for PE yet.

3.3 Relevance

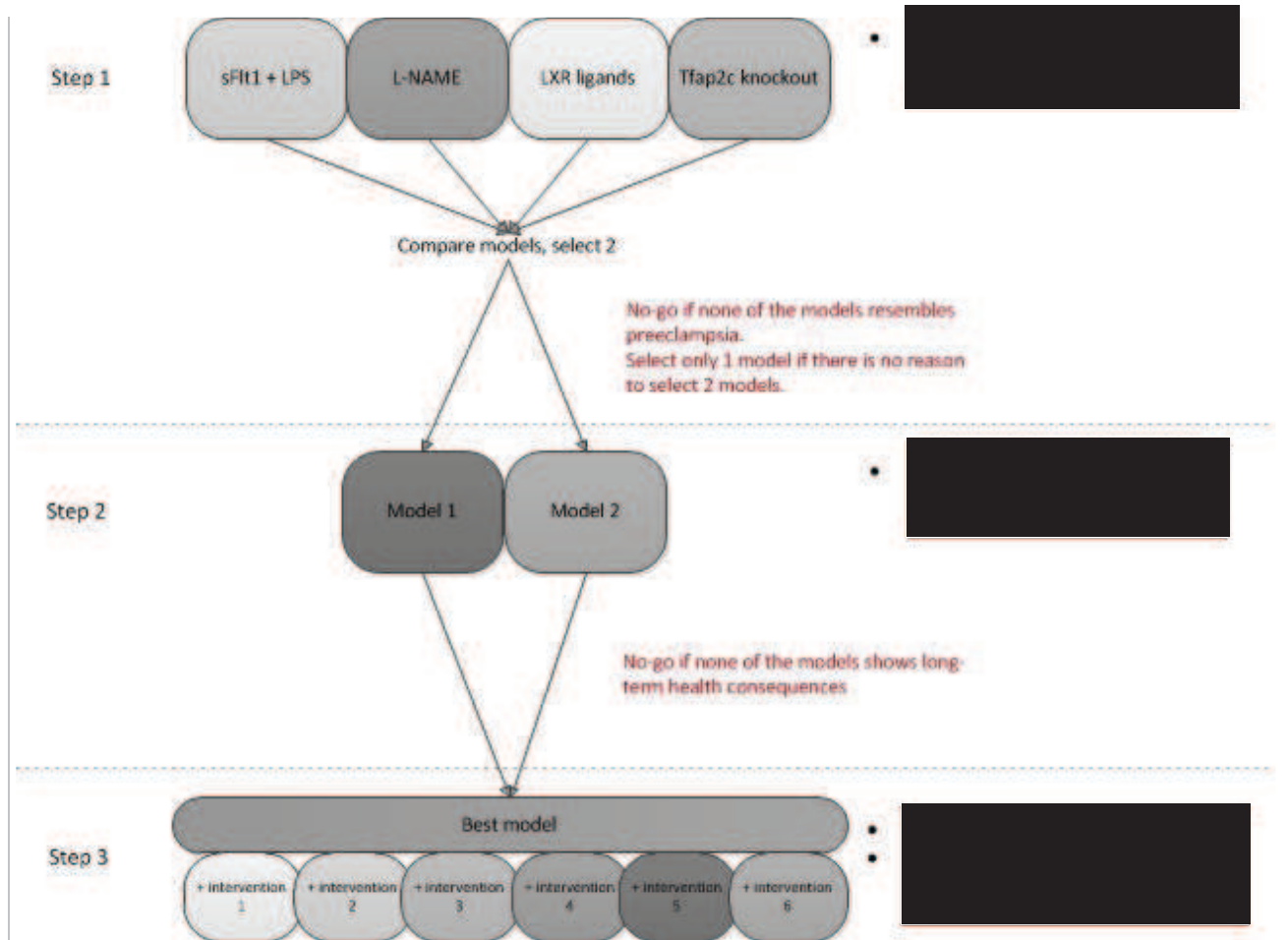
What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

2-8% of all pregnancies are complicated by preeclampsia and about 10% is complicated by placental insufficiency and IUGR (Paauw et al. 2017; Steegers et al. 2010). These complications are known to be a risk factor for metabolic syndrome and cardiovascular diseases in the offspring, which are the biggest health challenges of this era. Therefore, unravelling the role of intrauterine programming on gene expression and epigenetics in these diseases can help to fight these two very common categories of diseases.

Current therapies for hypertension and metabolic syndrome are initiated when the first signs of these diseases appear. However, if individuals at risk could be determined before these diseases show up, specific dietary advices or medication could be given to prevent the onset of these diseases, which would increase the quality of life of these individuals. PE and gestational hypertension lead to an increased risk of (gestational) hypertension and PE in the offspring and thus passes the risk of cardiovascular diseases through generations (Paauw et al. 2017). Ideally, this adverse fetal programming should be prevented, which would give more equal health chances to everyone.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).



In step 1, we will characterize and compare 4 promising preeclampsia-models. The main focus will be on the clinical symptoms and molecular changes during PE in the dam. If necessary, optimization will take place. Based on the outcome of step 1, we will choose the 2 most relevant models for step 2, which is a long-term follow up of the dam and her offspring. If there is no relevant or only 1 relevant model found in step 1, we will not continue with step 2 or we will only continue with 1 model. Finally, in step 3 we will test interventions in one of the long-term models of step 2. For this study, we will choose the model that is most relevant to the clinical situation.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

First, a proper model of preeclampsia is needed. In our pilot study we tested [REDACTED]. This study is still ongoing, but the results so far are promising. The dams show significantly elevated blood pressure and the pups are growth restricted, which both are major clinical symptoms in human PE. Since PE is a complex disease with many molecular characteristics of unknown etiology, all animal models for PE are mimicking only a part of the molecular consequences of PE in humans. Thus, only using one model does not give a clear answer to the question whether or not the outcome for mother and offspring is relevant for humans. So, because there is no model completely resembling clinical PE, we would like to use four different models. The outcome of several models together can indicate whether consequences found are related to PE in general, or only to the specific molecular changes in one model. On the one hand, this will strengthen the translation of our study to the human situation, and, on the other hand, this will give us mechanistic insight in which molecular changes are relevant for programming and which are not. Furthermore, this comparison of several models gives us the chance to select the most clinically relevant model(s) for further studies.

So, the first step in this research will be a systematic comparison of four different animal models for PE. If the results of this comparison give reasons to do so, optimization of the models will take place and

dams will be challenged with prepregnancy obesity. In this first step, terminal experiments to measure blood pressure will take place at gestational day 18, one day before estimated delivery. At this time point, blood and tissues of the mother and the offspring will be collected and analysed.

Second, long-term consequences of preeclampsia on offspring's health will be determined in 2 different mouse models. Based on the results of step 1, we will choose the two models best resembling human maternal and fetal pathology. Main parameters for choosing a model will be proteinuria, blood pressure and blood analysis (e.g. for inflammatory and angiogenic status) of the dam, weight of the fetuses and placental morphology. In this experiment, the offspring will be delivered and will age before termination.

. Before termination, metabolic tests will be performed. Organs and blood will be collected and analysed. The 2 different models should both be relevant for clinical PE and there should be differences between the models. If none of the models from step 1 is relevant for clinical PE, we will not perform this study. If only 1 of the models is relevant, or if all the relevant models show exactly the same phenotype, we will perform this study in 1 model. The similarities and differences between the 2 models will on the one hand increase the translatability of the results, and on the other hand give mechanistic insights in determining factors for programming of long-term health.

Third, once the model and its long-term consequences on offspring health are determined, interventions will be tested in the one model giving the most clinically relevant programming results. Most interventions aim to program the offspring for a healthier life later on, but prepregnancy obesity will be included as a 'negative intervention', because of its societal relevance.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

The three steps described will take place sequentially, and the results of the previous step are necessary for continuing to the next step. Therefore, if the results of the previous step give no scientific reason to continue, we will not proceed. So, for instance, if we establish only 1 mouse model for PE in step 1, we will continue with that one only in step 2, and if there is no adverse programming effect found in dam nor offspring in step two, we will not proceed to the testing of interventions in step 3. The main outcome parameters for a successful model of PE will be maternal blood pressure, maternal proteinuria and fetal weight. The main outcome parameters for programming of long-term consequences in both dam and offspring will be body weight and composition, blood pressure and metabolic parameters, with associated gene expression and epigenetics.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Preeclampsia and long-term programming of health
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Rijksuniversiteit Groningen
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | Preeclampsia and long-term programming of health |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Step 1: Comparison of animal models for preeclampsia

In humans, preeclampsia (PE) is characterized by elevated blood pressure and proteinuria. Furthermore, offspring is often growth restricted and levels of reactive oxygen species, cytokines, anti-angiogenic factors, angiotensin 1 agonistic autoantibodies and leptin are found increased in the maternal circulation. In this step, four animal models for PE will be systematically compared:

1. [REDACTED]

Primary outcome parameters will be maternal blood pressure and proteinuria and fetal and placental weight, since those are the clinically relevant parameters also found for humans. Since aortic blood pressure measurement is a terminal experiment and several tissues need to be collected, termination will take place at gestational day 18, right before the estimated delivery at gestational day 19. Collection of the pups and placentas from the uterus is necessary, firstly because the dam will eat the placentas and resorptions right after birth, and secondly because we need to register the location of each pup in the uterus, since this may influence programming. Male and female offspring will be analyzed separately. Collecting a large blood sample and all kinds of tissues, including heart, liver and brain, of the dam and

her fetuses at gestational day 18 will give us the opportunity to compare the short-term molecular consequences in these tissues to the long-term molecular consequences in step 2 and 3. The main analyses will be for circulating factors, proteinuria, morphology and gene expression of the placenta and gene expression and epigenetic marks in the tissues. This close biochemical and physiological comparison of these four models might show that an additional experiment is necessary to optimize or combine them. If this optimization-step takes place, we will also challenge the dams that are subjected to the most promising PE model with prepregnancy obesity.

Step 2: Long-term consequences of preeclampsia on offspring's health

In this step, the long-term consequences of PE on dam and offspring's health will be determined. To that end, we will use two models of step 1 that show a phenotype comparable to clinical PE. This decision will be based on the primary outcome parameters of step 1. Because the etiology of PE is unknown, spontaneous development of PE in mice is not possible. The several models mentioned in step 1 all target a different mechanism involved in PE. The use of 2 models targeting a different PE mechanism will have a lot of added value for this study. It will give us insight in whether observed consequences are specific to one model, or to PE in general. Furthermore, it will give us insight in the mechanisms playing a role in programming and it will make this study better translational to humans. Two different models will only be used if there are 2 clinically relevant models found in step 1. The relevance of a model will be assessed based on the primary outcome parameters of step 1 (blood pressure, proteinuria, circulating factors and fetal and placental weight). However, to have added value, the characteristics of the 2 models should not be exactly the same. In case more than 2 clinically relevant models are found, we will choose the 2 models that show the widest range of the clinical PE spectrum as possible. If there is only 1 clinically relevant model found in step 1, or if all the clinically relevant models show the same characteristics, we will only use one model in this step. If there are no relevant models found in step 1, step 2 and 3 will not take place.

After being exposed to PE, offspring will be kept for a maximum of 6 months.

. Primary outcomes for the offspring will be metabolic data, blood pressure and body composition, since these factors seem to be affected in the clinical situation. Furthermore, histological, epigenetic and gene expression analysis in several organs will give insight in the mechanisms playing a role. Metabolic data will be gathered at both 3 and 6 months of age. If the phenotype is strong and present at 3 months of age, the experiment can be stopped earlier.

After weaning, the dam will be kept up to 3 months to examine long-term consequences.

. Primary outcome parameters for the dam will be blood pressure, proteinuria and analysis of heart, liver, kidney and blood, since these parameters are most likely to be affected by PE.

Step 3: Test interventions to influence adverse fetal programming during PE

If programming of offspring's health by PE is found in step 2, interventions to influence adverse fetal programming will be tested. We will use the animal model from step 2 that showed the most clinically relevant programming effect. This choice will be based on analysis of blood, tissues and metabolism. If only one model is examined in step 2, that model will be used. If there is no programming-effect found in step 2, step 3 will not take place. Different interventions will, as an example, aim to improve the nutrient availability *in utero* or maternal status, leading to less fetal exposure to PE factors. For improving *in utero* conditions, dietary supplementation of several key nutrients,

will be tested. These dietary supplements and drugs are likely to have a positive effect on offspring's health. We will also include prepregnancy obesity as a 'negative intervention', because of its relevance for this westernized world.

Experimental setup and outcome parameters will be comparable to step 2.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Step 1: Comparison of animal models for preeclampsia

Procedures:

- Dam:
 - o vaginal smears: to determine the stage of the oestrus cycle
 - o induction of prepregnancy obesity with a dietary intervention
 - o overnight mating: since the induction of PE needs to happen at specified gestational days, mating will take place overnight.
 - o induction of PE: method differs per group
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - The use of a combination of these techniques in one group is also possible.
 - o blood sampling at one time point around mid-gestation to determine the level of [REDACTED] and other circulating factors.
 - o metabolic cage: to measure the level of proteinuria at the end of gestation, pregnant mice need to be in a metabolic cage for 24 hours to collect urine.
 - o blood pressure measurements using a tail cuff system. This involves short-term restraint of the mice. Mice will be trained for this procedure before onset of pregnancy, to reduce the level of stress during the relevant measurements during pregnancy. However, stress will still be a big confounder in this measurement. The most reliable and practical blood pressure measurement in mice is with a catheter in the abdominal aorta, but since this is a terminal experiment, this can only be done once. In this step, we will compare the blood pressures obtained with both methods. If they correlate, the tail cuff method can be used in the long-term experiments in step 2 and 3, since terminal aortic blood pressure measurement is not possible there during gestation.
 - o terminal blood pressure measurement: at gestational day 18, blood pressure will be measured by placing a catheter in the abdominal aorta, under anaesthesia, followed by urine collection and termination by cardiac puncture and cervical dislocation.
- Offspring:
 - o Termination by decapitation at gestational day 18.

Step 2: Long-term consequences of preeclampsia on dam and offspring health

Procedures:

- Dam:
 - o overnight mating
 - o induction of PE
 - o blood sampling around mid-gestation
 - o [REDACTED]
 - o tail cuff blood pressure measurement
 - o metabolic cage (in non-pregnant state)
 - o Ear punch for identification: necessary for group housing
 - o terminal aortic blood pressure measurement at a maximum of 3 months after weaning
- Offspring:
 - o Ear punch for identification: necessary for group housing
 - o [REDACTED]
 - o [REDACTED]
 - o feces collection: for collection of feces from the bedding, temporary individual housing is

necessary.

- Body composition measurement: a non-invasive and quick method to analyze body composition. This procedure will be performed a maximum of 4 times.
- glucose-, insulin- and pyruvate tolerance test: these tests give insight in the glucose metabolism of the animals. The mice will be fasted for <16 hours (exact time necessary differs per test; drinking water available *ad libitum*; extra bedding material provided for body heat preservation) and given a bolus of insulin, glucose or pyruvate (intraperitoneal or gavage). Blood samples will be taken to follow the response over time. These tests will all be performed 2 times.
- fasted blood sample. Mice will be fasted for 16 hours before a blood sample is taken. Water will always be available *ad libitum*. This will be done a maximum of 2 times, combined with the pyruvate tolerance test when possible.
- administration of stable isotope-labelled acetate: will be performed if body composition, blood analysis or results of the tolerance tests give an indication to further study metabolism. Labelled acetate will be administered in drinking water and several blood samples will be taken, without exceeding the limit for blood sampling. This procedure will be performed a maximum of 1 time.
- administration of a stable isotope-labelled metabolite: will only be performed if there is a good scientific reason to further study one metabolite. The metabolite (e.g. glucose) will be administered via oral gavage, intraperitoneal injection or intravenous injection. Several blood samples will be taken, without exceeding the limit for blood sampling. This procedure will be performed a maximum of 1 time.
- regular blood sampling: will not exceed the maximum of 8 mg/kg body weight per 14 days.
- NOTE: tolerance tests, labeled-isotope tests and (fasted) blood sampling will be planned well apart from each other (minimum 1 week), to allow the mice to recover and to stay within the maximum limits for blood sampling.
- Terminal blood pressure measurement with an aortic catheter, followed by bladder puncture, cardiac puncture and cervical dislocation at a maximum of 6 months after weaning

Step 3: Test interventions to influence adverse fetal programming during PE

Procedures: The used procedures will be the same as in step 2, with the addition of interventions for the dams.

- Dam:

- dietary supplementation, [REDACTED]
[REDACTED] Dietary supplementation will be done by mixing the supplements into the food.
- oral drug administration, [REDACTED]. This will be administered in the food or drinking water preferably, but in some cases injections or oral gavage might be needed.
- induction of prepregnancy obesity with a dietary intervention

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

To determine the number of animals, power analyses are performed for the primary outcome parameters. A power of 80% and α of 0,05 are used for the calculations. For step 1, blood pressure is the most important and most variable parameter. Expected difference (8mmHg) and standard deviation (6 mmHg) were taken from the currently running study. This gives an n of 12 per group. For step 2 and 3, circulating factors and metabolic tests are the most variable, since gene expression and epigenetic measurements are very precise and robust. An important outcome measurement is the insulin tolerance test. Based on the difference (39) and standard deviation (26; average of both groups) found in 3-month old females, an n of 10 per group should be sufficient (McDonnold et al., 2014).

The number of mice is kept to a minimum by critical judgement of the relevance of several (control) groups. We will analyse multiple experimental groups with one control group at the same time, which reduces the number of control groups needed. Furthermore, mating will be done in different cohorts, starting sequentially. This offers the possibility to stop the experiments if the group size is sufficient without using the extra mice calculated. Finally, males will be re-used as long as they are in their fertile age.

Reference

McDonnold, M., Tamayo, E., Kechichian, T., Gamble, P., Longo, M., Hankins, G. D. V, ... Costantine, M. M. (2014). The effect of prenatal pravastatin treatment on altered fetal programming of postnatal growth and metabolic function in a preeclampsia-like murine model. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 210, 542.e1-e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.01.010>

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species: experiments will be performed in mice, because of the experience with mice in our group, the possibility to compare our study to literature about programming, where mice are the major studied organism, and the possibility to compare our preeclampsia-results to earlier results and results from collaborators about intra-uterine growth restriction.

Origin: male and female C57BL6/J mice will be ordered from a licensed breeder. This strain is widely used in metabolic studies, which gives us the possibility to compare our results with literature. Pups delivered in the experiment will be own breeding. [REDACTED] mice and their controls will be obtained from a collaborator.

Life stages: females and males for mating will be obtained at breeding age. In step 1, termination of both dam and fetuses will take place at gestational day 18. In step 2 and 3, females will be used for one pregnancy and will be terminated at 3 months after weaning. Offspring will age until a maximum of 6 months after weaning.

Estimated numbers:

Step 1: 4 different models will be compared, and because 2 of these models will take place in the same place with a comparable procedure, only 3 control groups are required. This comparison of models can give rise to an additional optimization study for the 2 most promising models, of which one will then also be tested with prepregnancy obesity. 2 control groups will be necessary here, one without PE and without prepregnancy obesity and one without PE but with prepregnancy obesity. So, the maximum number of groups in this first step is 12.

Based on expected difference between the groups, a sufficient group size for finding significant differences is 12 dams per group. We apply for 50% extra, because of two reasons. Firstly, our experiences are that not all dams get pregnant, even not after a few rounds of mating. Secondly, we will exclude dams with an extremely small or large nest (<4 or >9 pups), since this will influence offspring metabolism. Based on our pilot study, we believe that 50% extra dams should be sufficient to counteract these two factors. Once the number of 12 dams in a group is reached, we will stop adding new mice to the group and the remaining dams will not be used for this experiment.

- females: 216 (12 groups * 12 per group + 50% reserve (10% for small/large litters + 40% for non-pregnant; 159 pregnant, 57 non-pregnant)
- males for mating: 15
- Offspring: 954 (159 dams with an average of 6 pups per dam)

Step 2:

We will examine the offspring of two PE models. It is dependent on the similarity between the used

models if we need 1 or 2 control groups. Males and females will be analyzed separately, since programming effects differ widely between the sexes. The offspring will be challenged with 3 different diets, of which one is the control diet.

Per PE model:

- Offspring in experiment: 144 (12 groups (+/- PE (2), males/females (2), +/- dietary challenge (3) * 10 per group)
- Dams: 36. (144 offspring / 6 offspring per dam = 24 dams needed to produce 144 offspring. As in step 1, a margin of 50% extra females will be used. $24 + 10\% = 27$ will get pregnant)
- Males: 5
- Offspring terminated after birth: 18 pups are expected to come from a litter <4 or >9 . (10% of all dams are expected to deliver such a litter. Thus $3 \text{ dams} * 6 \text{ offspring on average} = 18 \text{ pups}$)

Total of 2 PE models:

- Dams: 72 (54 pregnant, 18 non-pregnant)
- Males: 10
- Offspring in experiment: 288
- Offspring terminated at birth: 36

Step 3:

We will test 6 interventions. For logistic reasons, it is not possible to test all types of interventions simultaneously. Therefore, we will perform the study in two cohorts. Besides the intervention-groups, each cohort needs 2 control-groups, with PE and without PE. This gives a total of 10 groups of dams of which 2 groups are not exposed to PE. Since status of the offspring will be the main outcome, their desired number will be the main determinant for the number of dams. The offspring will not receive interventions or different diets. Males and females are separately analyzed, which gives a total of 20 ($10 * 2$) groups to analyze. Therefore, the number of offspring needed for the long-term study is 200 (20 groups * 10 per group).

The number of dams needed to produce 200 offspring is 33 ($200/6$ pups per dam). However, this only gives us ($33 \text{ dams} / 10 \text{ groups} =$) 3 dams per condition, which might be too little to overcome the individual differences between the dams. We would like to use 5 dams per condition, which will give us a total of 50 dams. $50 + 50\% = 75$ dams. To have 50 dams with a sufficient nest size, $50 + 10\% = 55$ dams have to get pregnant and deliver. They will deliver an estimation of ($55 * 6 =$) 330 offspring, of which 200 will continue in the experiment after weaning and 130 ($330 - 200$) will be terminated after birth or weaning. Of the mice terminated after weaning, tissues will be stored for analysis or primary cells will be isolated for *in vitro* experiments.

To summarize step 3:

- Dams: 75 (55 pregnant, 20 non-pregnant)
- Males: 10
- Offspring: 330 (200 in long-term experiment, 130 terminated after birth)

To summarize the whole project:

	Dams (not pregnant)	Dams (in experiment)	Males for mating	Offspring (terminated in fetal stage or 1 day after delivery)	Offspring (in long-term experiment)
Step 1	57	159	15	954	0
Step 2	18	54	10	36	288
Step 3	20	55	10	130	200

Total	95	268	35	1120	488
--------------	-----------	------------	-----------	-------------	------------

This gives a total of 2006 mice.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

☒ Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

The experiments for the dam and her offspring will be terminal, since blood pressure will be measured in the aorta and organs will be collected. The males will be used for mating only. We will use them repeatedly and afterwards they can be re-used by others.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

☒ No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: Fetal programming of later-life health is a result of complex cross-talk between the mother, her fetus and many organs, which cannot be mimicked in a cell line or organoid yet. We do try to examine the impact of one specific factor on developing cells, but this does not resemble the complex embryogenesis. Since analysis of tissues of the offspring is necessary to unravel this mechanism, a human study would not be sufficient, and has as additional downside that many cofounders are present which cannot be controlled for. As mentioned in the proposal form, some human studies to long-term consequences of PE have been performed, but they are not conclusive yet, because of the downsides mentioned. Therefore, this animal study is necessary to determine long-term consequences, to examine the mechanisms involved and to test interventions.

Refinement: While designing the experiment, animal welfare was a major priority and unnecessary procedures are avoided. For instance, when the PE models are established in step 1, there is no need to subject the pregnant dams to a stay in the metabolic cage in step 2 and 3 anymore. For analysis of body composition, we will use a specialized body composition measurement machine instead of DEXA scanning, because the latter is more stressful. During the long-term study (step 2), regular monitoring of bodyweight and composition will take place and if there is no need to continue experiments, either because there is no scientific reason to do so or because the desired end points are already met, we will end them. During stressful procedures, such as intravenous injections, the mice will be anaesthetized for a short time. Of course, all procedures will be performed by experienced and trained individuals.

Reduction:

By having several experimental groups in parallel in step 1 and 3, the amount of control groups necessary is drastically reduced. Stress responses are known to be a major confounder in fetal programming. By prioritizing animal welfare, the intra-individual variability decreases, which means less animals are needed. Males and females differ in their response to intrauterine challenges, and thus need to be analyzed in separate groups. On the one hand, this reduces the number of animals per group, since there is less intra-individual variability. On the other hand, by analyzing both the males and the females and not only one sex in this experiment, no animals will be wasted and there is no need to replicate the experiment with the other sex later on. We will only use litters containing 4 to 9 pups and shortly after birth, nest size will be regulated by moving pups between the nests to 5 to 8 pups per nest, which, again, decreases intra-individual variability. By accepting these ranges of litter and nest sizes, the percentage of 'successful' pregnancies will be high while intra-individual variability will be kept to a minimum. Furthermore, after weaning, the pups of one dam will be divided into the different offspring groups, to diminish the influence of the nest. Therefore, less nests and thus less dams and pups are

needed. Finally, long-term consequences for both dam and offspring will be analyzed and males are used for multiple rounds of mating, making that no mice will be wasted.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

With the design of our experiments, we always thought of how to minimize stress for the mice (see 'refinement'). Besides that, the mice will be monitored regularly and observations will be tracked in their welfare diary. If the animal is in distress termination will take place. We will use an adenovirus carrying [REDACTED] Mice will be transferred to the Biosafety Level 2-area of the animal facility before injections, where they will stay in individually ventilated cages until termination. Of all animals, waste will be collected and disposed following local law and regulations.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Extensive literature search has been performed to identify similar studies. The PE models using [REDACTED] [REDACTED] have been studied by other groups, but a systematic comparison, full characterization and long-term studies are lacking. The [REDACTED] model is tested in a pilot study by our group to optimize the method. Research towards metabolic programming by PE is scarce, and the effect of a dietary challenge for the offspring or interventions for the dam is, to our knowledge, not examined yet. Moreover, our epigenetic lab technique for the read-outs has not been used in these models before. During the studies we will of course keep up with literature in our field to prevent unnecessary experiments.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

☐ No

☒ Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

In general, the mice will be socially housed in groups. However, during some procedures group housing is not possible. Mice will be individually housed during, for instance, pregnancy and weaning, metabolic cage and feces collection.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

☒ Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

☐ No > Justify why pain relieving methods will not be used.

☒ Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

For some procedures, e.g retroorbital injections, it is necessary to sedate the mice with an anaesthetic (isoflurane). This will be for a short amount of time and recovery of the mice after anaesthesia will be monitored.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Metabolic syndrome, obesity and/or diabetes and the symptoms of PE might have adverse effects on animal welfare. Offspring might experience stress *in utero* because of the exposure to preeclampsia.

Explain why these effects may emerge.

The offspring receive a dietary intervention to challenge metabolic capacity. This can lead to the development of the metabolic syndrome, obesity and/or diabetes. Induction of PE will lead to elevated blood pressure and kidney damage in the dams. The offspring might sense that there is something 'not normal' which can cause stress.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

We will regularly monitor body weight and body composition, and around 3 months of age, glucose-, insulin-, and pyruvate tolerance tests will take place. If the mice by then already show an altered metabolic capacity, there is no need to continue the experiment and to increase the severity of the metabolic problems for the mice. In our current pilot project, the dams do not seem to suffer from the elevated blood pressure and kidney damage. Their general appearance, number of pups, number of fetal resorptions and body weight gain do not differ from the control group.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☒ No > Continue with question K.

☐ Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Cumulative discomfort:

- Dams: moderate
- Offspring: mild

The males will not get any discomfort-causing treatment.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

☒ Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

In step 1, blood pressure of the dam will be measured in the aorta. This is a terminal experiment. In all

steps, tissues and blood of both dam and offspring need to be collected for further analysis. Males will be used for multiple rounds of mating and can be re-used by other groups of for educational purposes afterwards. When they cannot be re-used by others, they will be terminated.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

☐ No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

☒ Yes

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8096**
2. Titel van het project: **The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring in mice**
3. Titel van de NTS: **Het effect van pre-eclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn in muizen**
4. Type aanvraag:
X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC : **04-04-2017**
 - ☐ aanvraag compleet: **04-04-2017**
 - ☐ in vergadering besproken: **13-04-2017**
 - ☐ anderszins behandeld: **08-05-2017, 11-05-2017**
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot **18-04-2017 tot 08-05-2017**
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - ☐ aanpassing aanvraag: **08-05-2017**
 - ☐ advies aan CCD: **19-05-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vraag / vragen:
 - Verstrek(e) antwoord(en):
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **18-04-2017**
 - Gestelde vraag/vragen:
 - 1/ Mogelijk is het raadzaam de diersoort in de titel van project te vermelden alsmede in de titel van de NTS.
 - 2/ De reden om de dieren te termineren lijkt wat kort door de bocht:
 - zo geldt als belangrijke grond voor het termineren dat "blood pressure of the dam will be measured in the aorta and this is a terminal experiment". In hetzelfde projectvoorstel wordt regelmatig bij de dieren "blood pressure measurements using a tail cuff system uitgevoerd". Wanneer enkel niet-invasief de bloeddruk wordt gemeten (aannemende dat deze methode reeds is gevalideerd aan de hand van de bloeddrukmeting in de aorta) vervalt, lijkt het, de grond voor terminatie in dit opzicht.

- De experimenten met het moederdier en nakomelingen zullen terminaal zijn omdat bloeddruk in de aorta gemeten zal worden en de organen verzameld worden. De organen worden verzameld immers "primary outcomes will be and analysis of heart, liver, kidney and blood, since these parameters are most likely to be affected by PE". Zouden niet-invasieve imaging en bloedonderzoek geen alternatief kunnen zijn om functies van organen als hart respectievelijk nieren te monitoren waardoor terminatie zou kunnen worden voorkomen?
- Het verdient misschien aanbeveling in de aanvraag wat nadere toelichting te geven op terminatie als reden voor het verzamelen van placenta's daar tijdens de partus de placenta's natuurlijk in principe automatisch met de pups meekomen.

3/ Het ongerief voor de moeders in appendix 1 zou moeten worden aangepast naar 'moderate'

4/Bij een vastenprocedure van 16 uur zouden de muizen in 'torpor' kunnen gaan. Houdt u daar rekening mee?

5/ Er is sprake van tegenstrijdigheid in de tekst onder I en J van de bijlage: onder I wordt aangegeven dat "If any adverse consequences arise, we will apply the humane endpoints", terwijl onder J wordt gesteld dat geen omstandigheden die mogelijk leiden tot het opwekken van humane eindpunten worden verwacht. Beschrijving van humane eindpunten lijkt (met het oog op met wat onder J gesteld wordt) dan toch wenselijk.

6/ Ten aanzien van de proefopzet en statistiek heeft de DEC een redelijk aantal kanttekeningen en die staan hieronder beschreven onderverdeeld in design, sample size berekening en geschatte aantallen.

Het design is niet erg duidelijk beschreven (m.n. de stappen). Enkele voorbeelden: Stap 2 en 3 beginnen met te stellen dat het meest veelbelovende model uit de vorige stap wordt gekozen (stap 2 -> het model uit stap 1 met het fenotype meest vergelijkbaar met klinische PE; stap 3 -> het model met het meest relevante 'programming defect'), maar in stap 2 wordt daarna gesteld dat ook andere modellen gebruikt kunnen worden. Daarmee wordt de beslis-structuur voor de DEC wat onduidelijk. Stel je kiest in stap twee 1 model dat het voldoende goed doet, dan is dit automatisch het model voor stap 3. Moet je in stap 2 dan niet altijd alle modellen testen om in 3 het meest relevante 'programming defect' te kiezen en om inzicht te krijgen hoe je vanuit de verschillende modellen (in samenhang) delen van het klinisch beeld verklaart? Tevens zou de DEC duidelijker gesteld willen hebben wat de primaire uitkomstparameters zijn in stap 2 en 3 (wel omschreven in stap 1). Bijkomend punt is dat in stap 3 in één keer apart naar vrouwen/mannen wordt gekeken. Zijn man/vrouw verschillen niet mogelijk ook relevant voor de eerdere stappen?

Verder is de sample size berekening onvoldoende beschreven. De DEC zou graag een getalsmatige uitwerking hiervan zien (zowel voor stap 1 als stap 2/3), inclusief de gebruikte power en alfa. Dit mede omdat de paper die de aanvrager citeert een kleinere sample size heeft (n=6-8) dan de sample size (n=12) die men nu voorstelt.

Ook vraagt de DEC zich af of het klopt dat eenzelfde sample size wordt gehanteerd voor stap 1, 2 en 3. Stap 3 is interventie studie, waarbij het waarschijnlijk is dat de 'effect sizes' lager zullen zijn dan in stap 2 (tenzij er complete genezing plaats vindt).

Tevens de vraag of sekse nog een rol heeft gespeeld in de overwegingen, aangezien hier bij mannen en vrouwen apart naar wordt gekeken. Zijn de effecten hetzelfde bij man/vrouw? Is een eventueel sekse verschil iets wat getoetst wordt? Moet je een sekse verschil mogelijk eerst uitzoeken in stap 2 voordat je dit in stap 3 verder kan uitwerken? Etc. En is het waarschijnlijk dat de 'effect size' voor stap 1 (totaal andere uitkomstparameter) precies hetzelfde is?

Ten slotte de geschatte aantallen. De DEC vindt het rekenen met 'we nemen x procent extra' verwarrend, en vraagt zich af of dit correct is. Voorbeeld is stap 2. Er wordt gesteld dat 144 afspring nodig is. Door de extra inclusie van dams zullen er naar verwachting 26 zwangere dieren zijn, die $26 \times 6 = 156$ pups leveren. Hiervan zullen 14.4 dieren getermineerd worden waarmee je zo rond de 141 dieren uitkomt, onder het aantal dat men berekend had nodig te hebben. Verdere onduidelijkheid is dat voor stap 2 en 3 wordt gerekend met een groepsgrootte van n=10, terwijl in de 'sample size' beschrijving uitgegaan werd van n=12 per groep.

Verder lastig punt vindt de DEC de behoorlijke overproductie in stap 3 om voldoende variatie te krijgen binnen de condities. Dit lijkt een na te streven strategie om meer variatie te hebben, maar valt dit niet op een andere manier te bereiken? Terminatie na de geboorte van 40% van de afspring vanwege surplus vindt de DEC wel erg veel.

Verder vraagt de DEC zich af of het geheel van stap 3 wel praktisch haalbaar is. De aanvrager wil een 10/10 man/vrouw verdeling met 5 dams die men al moet behandelen terwijl men nog niet weet hoeveel afspring ze gaan krijgen en in welke man/vrouw verhouding (en ze kunnen ook nog een afwijkend nest krijgen qua grootte dat getermineerd moet worden). Klinkt als een enorme kluit waar men 'statistisch gezien' waarschijnlijk nog veel meer dieren voor moet includeren?

Een andere gedachte hierbij is: speelt de kans op een afwijkend nest (terminatie) zich niet af op niveau van elke groep i.p.v. op het niveau van de populatie (50+5 versus 50+10*1)? Op het moment van behandeling (in ieder geval voor de in utero behandelingen) weet men nog niet of men 5 of 6 dieren nodig hebt (6 in het geval van een afwijkend nest) en dus zal men 6 dieren behandelen per conditie (totaal 60 ipv 55). Zullen er vanwege de controle groepen mogelijk minder zijn, maar het is

een schets van zaken waarvan de DEC zich afvraag of de onderzoeker er rekening mee heeft gehouden.

- Datum antwoord: **08-05-2017**
- Verstrekt(e) antwoord(en):

1. Titel proposal en NTS gewijzigd
2. Redenen voor terminatie stap 1
 - a. Bloeddrukmeting: invasief meten in de aorta een betrouwbare methode. De functionaliteit van het tail cuff systeem in muizen is discutabel, omdat muizen hier niet goed voor te trainen zijn en de stressrespons dus een grote rol speelt. Daarom willen we hier beide doen, en als de tail cuff waardes waardevol blijken te zijn, omdat ze correleren met de aorta-waardes, kunnen we dit in stap 2 en 3 toepassen. Als de tail cuff methode niet betrouwbaar blijkt te zijn moeten we in stap 2 en 3 terugvallen op de bloeddrukdata uit stap 1.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 2 a in wijzigingen-overzicht.
 - b. Niet-invasieve imaging technieken en bloedonderzoek in de moeder tijdens de zwangerschap zijn geen onderdeel van de klinische criteria. Daarnaast hebben we een groot bloedsample van de moeder nodig voor analyses, meer dan in 1 sample afgenomen kan worden. Met de huidige studie is de hoeveelheid die we verkrijgen met een cardiac puncture amper voldoende voor alle nodige metingen.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 2 b in wijzigingen-overzicht.
 - c. Tijdens de partus worden placentas en resorpties opgegeten door de moeder, dus is verzamelen niet meer mogelijk, tenzij de onderzoeker ze verzamelt tijdens de bevalling. Dat zou grote stress veroorzaken bij de moeder, wat waarschijnlijk gevolgen heeft voor de pups. Daarnaast functioneert de placenta na bevalling waarschijnlijk niet meer hetzelfde als tijdens de zwangerschap, waardoor de analyse ervan niet representatief is voor de situatie tijdens de zwangerschap. Daarnaast is het belangrijk om de plek van de foetus in de uterus te registreren, omdat bekend is dat dit een programming-effect kan hebben.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 2 c in wijzigingen-overzicht.
3. Ongerief moeders
 - a. Ongerief moeders moderate ipv mild
 - Tekst gewijzigd, zie punt 3 a en b in wijzigingen-overzicht.
 - b. Daarnaast is er nog 1 handeling die we graag willen toevoegen: het afnemen van een bloedmonster bij de zwangere dam tijdens de zwangerschap. Dit is nodig om bijvoorbeeld de XXXX levels te bepalen.
 - Tekst gewijzigd zie 3 c in wijzigingen-overzicht.
4. Torpor
 - a. Bij een glucose tolerantie test is 16 uur vasten standaard in de literatuur. Wijzelf of collega's hebben nooit problemen gehad met torpor. De muizen zullen tijdens het vasten in hun normale groepsverblijf blijven, waardoor ze warmte beter vasthouden. Ook zullen we extra nestmateriaal beschikbaar stellen voor extra isolatie.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 4 a in wijzigingen-overzicht.
5. Humane endpoints
 - a. Dit is een fout van onze kant. Naar aanleiding van het overleg met de IvD is besloten dat er geen humane eindpunten te verwachten zijn als gevolg van de experimentele procedures.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 5 a in wijzigingen-overzicht
- 6-1. Design
 - a. Beslis-structuur: naar aanleiding van de vragen van de DEC hebben we besloten 2 modellen tegelijk te testen in stap 2, tenzij er niet 2 geschikte modellen worden gevonden in stap 1. De modellen moeten beide klinisch relevant zijn, en daarnaast moeten ze niet exact hetzelfde zijn. Op deze manier wordt de relatie tussen het ziektebeeld van de moeder en de gevolgen voor het nageslacht duidelijker. Als de inductie van preeclampsie op een vergelijkbare manier verloopt is er hierdoor ook maar één controlegroep nodig.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-1 a, b, c, d, e en f in wijzigingen-overzicht
 - b. Primaire uitkomstparameters
 - Zie wijzigingen bij de vorige vraag over beslis-structuur
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-1 g en h in wijzigingen-overzicht
 - c. Mannen/vrouwen: het is bekend dat de gevolgen van programming sterk verschillen tussen de geslachten. Ook in stap 1 en 2 worden mannetjes en vrouwtjes dus apart van elkaar geanalyseerd. In stap 1 is de statistische berekening gebaseerd op de moeders. Met een

gemiddelde van 6 pups per moeder zullen hier genoeg pups uit voortkomen om mannetjes en vrouwtjes apart van elkaar te analyseren. In stap 2 was dit al meegenomen in de berekening.

- Tekst gewijzigd, zie punt 6-1 *i* en *j* in wijzigingen-overzicht.

6-2. Sample size

- a. Berekening: In de geciteerde paper is de uitkomst van de insulin tolerance test, voor ons een belangrijk resultaat, net niet significant. Dit is uitgevoerd met een *n* van 7 of 8 per groep (vrouwen, 3 maanden oud). Een hogere *n* is dus noodzakelijk. De poweranalyses behorende bij de al vermelde groepsgroottes zijn toegevoegd.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-2 *a* in wijzigingen-overzicht.
- b. Eenzelfde sample size voor alle stappen: de sample size van stap 1 is met andere primaire uitkomstparameters uiterekend dan de sample size voor stap 2 en 3. Omdat er nog niet eerder interventies getest zijn die het programming-effect van preclampsie proberen te verminderen, weten we niet hoe groot de effect size zal zijn. Om relevant te zijn hoeft de effect size echter niet zo groot te zijn dat er een significant verschil optreedt tussen de PE-groep en de interventie-groep. Als de interventiegroep niet meer significant verschilt van de controlegroep, terwijl de PE-groep dat wel doet, geeft dat ook al veel informatie.
- c. Mannen/vrouwen
 - Zie 6.1 c in dit document.

6-3. Geschatte aantallen

- a. 'x' procent extra: de verwarring lijkt te zijn ontstaan door het afronden van getallen. Wanneer er gerekend wordt met niet-afgeronde getallen klopt de berekening wel. Voor de helderheid hebben we de decimale getallen in stap 2 aangepast naar hele getallen. Hierdoor is het totaal aantal vrouwtjes niet gewijzigd, het aantal vrouwtjes wat zwanger wordt en dus het aantal pups wel. Hierdoor vragen we in totaal 8 dieren extra aan.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-3 *a* in wijzigingen-overzicht
- b. *n*=10 of *n*=12 in stap 2 en 3: in stap 2 en 3 geldt *n*=10, de *n*=12 die vermeld werd in onderdeel 2A is een typefout.
 - Tekst gewijzigd, zie 6-2 *a* in wijzigingen-overzicht.
- c. Overproductie stap 3: wij zien hier helaas geen alternatieven voor. Al het nageslacht gebruiken zonder de groepsgrootte te vergroten levert een te grote invloed van het nest van herkomst op. Idealiter zou er uit elk nest slechts 1 mannetje en 1 vrouwtje gebruikt worden, zodat dit volledig onafhankelijke experimentele units zijn. Dit zou echter een veel grotere aantal surplus dieren opleveren. Door uit elk nest 2 mannetjes en 2 vrouwtjes te gebruiken en ook nesten met 1 mannetje of 1 vrouwtje te includeren denken we een middenweg gevonden te hebben tussen de ideale situatie en praktische haalbaarheid. Van de surplus dieren zullen we wel de weefsels opslaan voor latere analyse en/of primaire cellen uit de weefsels isoleren.
 - Tekst gewijzigd, zie 6-3 *b* in wijzigingen-overzicht
- d. Haalbaarheid: voor een 10/10 man/vrouw verdeling met 5 dams zijn er gemiddeld 4 pups per dam nodig, waarvan 2 mannetjes en 2 vrouwtjes. Het zal voorkomen dat een nest geen 2 mannetjes en 2 vrouwtjes bevat. We gaan dit dan compenseren door extra mannetjes of vrouwtjes uit een ander nest te gebruiken. Omdat niet alle vrouwtjes tegelijk zwanger worden, hebben we veel flexibiliteit in het includeren van extra dieren. Dit is uitgewerkt in het volgende punt.
- e. Kans op afwijkend nest: niet alle dams worden tegelijk zwanger, om biologische en praktische redenen. De zwangerschap is slechts 18 dagen, dus we hebben de mogelijkheid om eerst 5 dams aan een behandeling bloot te stellen, en als daar na de bevallingen een niet-buikbaar nest bij blijkt te zitten een extra dam te includeren. Daarnaast beginnen de preeclampsie-inducerende behandelingen, met uitzondering van het genetische model, pas op dag 8 van de zwangerschap. Dit zorgt ervoor dat we flexibel zijn in het plaatsen van dieren in behandelgroepen als we bij aanvang van de zwangerschap nog niet weten in welke groep nog een extra dier nodig is. Het is dus niet nodig om in elke groep gelijk al 6 dieren te behandelen per conditie.
 - Tekst gewijzigd, zie 6-3 *c* in wijzigingen-overzicht.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

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

JA

2. De aanvraag betreft **een nieuwe aanvraag**

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

JA

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

n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft helder criteria beschreven op basis waarvan zal worden besloten het project wel of niet te continueren. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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

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

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

De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

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

Het directe doel is het ophelderen van de gevolgen (op moleculair niveau) van pre-eclampsie bij de moeder en nakomelingen, dit aan de hand van 1 of meer muismodellen. Het uiteindelijke doel is om intrauterine gen expressie programmering bij pre-eclampsia beter te begrijpen en daarmee de complicatie en de gevolgen hiervan bij de nakomelingen, zoals bijvoorbeeld metabool syndroom en cardiovasculaire aandoeningen, terug te dringen. Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het project betreft een fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. het hiervoor beschreven directe doel; het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project naar alle waarschijnlijkheid niet gehaald worden. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project zijn de proefdieren, en op langere termijn mensen lijdend aan (de gevolgen van) pre-eclampsie

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor mensen bevorderd kunnen worden: door mechanismen in de intrauterine gen expressie programmering bij pre-eclampsie beter te begrijpen kunnen mogelijk zowel de complicatie's als ook de gevolgen hiervan voor het nageslacht, teruggedrongen worden.

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

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

Proefopzet en haalbaarheid

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

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output en de verkregen financiering.

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

De DEC heeft zich ervan vergewist dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **NVT**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De aanvrager heeft aangegeven dat over het algemeen de dieren, volgens de richtlijnen sociaal gehuisvest worden. Gezien de aard van sommige procedures (b.v. dracht, zogen, huisvesting in een metabole kooi en bij het verzamelen van feces) is sociale huisvesting hachelijk en aanvrager heeft voldoende onderbouwd waarom in deze gevallen individuele huisvesting zal plaatsvinden.

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

Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het ongerief voor de proefdieren te identificeren, te

verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

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

De integriteit van het dier wordt aangetast door het herhaald uitvoeren van tolerantietesten en het toedienen van endotoxines door middel van intraperitoneaal injecteren, het toepassen van anesthesie en individuele huisvesting uiteindelijk leidend tot de opoffering aan het eind van de proeven.

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

Naar de mening van de DEC zijn de criteria voor humane eindpunten in deze aanvraag goed beschreven.

3V's

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

De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe gevolgen van pre-eclampsie zijn niet *in vitro* na te bootsen.

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

Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties

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

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

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

NVT, want het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

In de onderhavige projectaanvraag worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De aanvrager heeft hiervoor naar mening van de DEC voldoende onderbouwing gegeven. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden, daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

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

Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager: dieren worden gedood om weefsel te kunnen uitnemen voor verdere analyse.

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

NVT

NTS

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

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging.

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**", dat gericht is op het doorgronden van het mechanisme van pre-eclampsie teneinde deze aandoening te kunnen voorkomen dan wel te behandelen bij de mens het lichte dan wel matige ongerief, dat de muizen wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht-matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel reëel voordeel.**

Algemeen: **het ophelderen van het mechanisme van pre-eclampsie aan de hand van 1 of meer muismodellen.**

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen binnen het project "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht tot matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal onder meer worden aangetast door het herhaald uitvoeren van tolerantietesten en het toedienen van endotoxines door middel van intraperitoneaal injecteren, het toepassen van anesthesie en individuele huisvesting uiteindelijk leidend tot de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een uitbreiding van wetenschappelijke kennis over het mechanisme van pre-eclampsie teneinde deze aandoening te kunnen voorkomen dan wel te behandelen bij de mens. Voor de maatschappij is verbetering van het welzijn mogelijk ten aanzien van het in positieve zin beïnvloeden van de negatieve aspecten van deze aandoening. Dit verhoogt de levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven bij de moeders en mogelijk ook het nageslacht ervan.

Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van reëel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**", de opoffering en het lichte dan wel matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend.

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

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

De DEC-RUG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RUG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RUG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1050020171824

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 mei 2017. Het gaat om uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020171824. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

23 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171824

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171824

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 15 juni 2017
Geplande einddatum: 15 juni 2022
Titel project: The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring
Titel niet-technische samenvatting: Het effect van preeclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn
Naam DEC: DEC-RuG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Hoogleraar RUG
Plaats: Groningen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1050020171824

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 mei 2017

Vervaldatum: 22 juni 2017

Factuurnummer: 171824

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020171824	€ 1035,-

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1050020171824

Datum 26 mei 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 19 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" met aanvraagnummer AVD1050020171824. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

Er worden pups gedood vóór de geboorte en ná de geboorte. Kunt u aangeven hoeveel pups er vóór de geboorte gedood worden en hoeveel erna?

De pups worden gedood door decapitatie. Dit is alleen toegestaan als een andere dodingsmethode niet mogelijk is. Kunt u aangeven waarom andere dodingsmethodes niet mogelijk zijn?

Er worden 35 mannelijke dieren ingezet voor de fok. Deze dieren zullen geen ongerief ervaren en vallen hiermee niet onder een dierproef. Kunt u het aantal dieren in de NTS aanpassen naar 1971, zodat deze mannelijke fokdieren niet meegeteld worden? U kunt deze dieren eventueel wel benoemen.

Leges

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

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

Datum:

26 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Rijksuniversiteit Groningen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1050020171824

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

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

☐ Projectvoorstel

☐ Beschrijving Dierproeven

☐ Niet-technische samenvatting

☐ Melding Machtiging

☐ Aanvraagformulier

☐

☐

☐

Datum:

26 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

Aanvulling CCD AVD1050020171824

- Aantal pups vóór en na geboorte getermineerd

In stap 1 zullen de foetussen getermineerd worden op dag 18 van de zwangerschap. Naar schatting zullen dit 954 pups zijn. In stap 2 en 3 zullen de pups die niet gebuikt worden in het lange-termijn experiment kort na de bevalling getermineerd worden. Naar schatting zijn dit 166 pups.

- Waarom pups termineren met decapitatie

Omdat verschillende organen, waaronder de hersenen, en een bloedmonster moeten worden afgenomen, is het belangrijk een methode te gebruiken waarbij dat mogelijk is. Foetussen zijn ongevoelig voor terminatie met behulp van CO₂ of een overdosis anesthetica. Met decapitatie kan er direct een bloedmonster afgenomen worden en blijven de weefsels intact. Daarnaast is deze methode van terminatie sneller en betrouwbaarder bij deze kleine dieren dan cervical dislocation.

- Mannetjes zijn geen proefdieren

35 mannetjes zijn verwijderd uit de NTS.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1050020171824

Bijlagen

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 19 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" met aanvraagnummer AVD1050020171824. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het aantal foeten, de dodingsmethode van de foeten en een aanpassing van de NTS in het aantal dieren.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

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

U kunt met uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 juni 2017 tot en met 14 juni 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RuG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 mei 2017. Bij de beoordeling

van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:

6 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 juni 2017 tot en met 14 juni 2022, voor het project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" met aanvraagnummer AVD1050020171824, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RuG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD kandidaat.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 mei 2017, ontvangen op 19 mei 2017.
 - d De aanvulling op uw aanvraag, ontvangen op 6 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Preeclampsia and long-term programming of health				
	Muizen (Mus musculus) /	1.971	18% Matig 82% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

Aanvraagnummer:
AVD1050020171824

worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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