

	Dossier: AVD10800202317227	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	
3	Projectvoorstel	
4	Bijlage beschrijving dierproeven	
5	DEC-advies	
6	Ontvangstbevestiging	
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	
	Evt. antwoorden aanvrager	
7	Beschikking en vergunning	

Due to intellectual property information, the rest of the license will follow after publication.

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Oorzaken van gefaalde embryo-innesteling en drachtverlies bij de merrie
NTS-identificatiecode	NTS-NL-770836 v.1, 14-11-2023
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	paard embryo baarmoeder dracht innesteling
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Urogenitaal / voortplantingsstelsel

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Bij 1 op de 5 echtparen lukt het niet om binnen één jaar kinderen te krijgen. Om toch zwanger te raken, maken deze echtparen vaak gebruik van in vitro fertilisatie (IVF: reageerbuis bevruchting). Echter, slechts 30% van alle IVF pogingen leiden tot een levend geboren baby. Het merendeel van de mislukkingen treedt vroeg op in de zwangerschap en de meest voorkomend onderliggende oorzaken van een miskraam zijn; 1) een oneigenlijke aantal chromosomen (DNA) in de eicel of embryo (de zogenaamde "aneuploidie"). Chromosomen zijn de dragers van de erfelijke informatie in de kern van een cel en een verkeerde aantal chromosomen leidt of tot het vroegtijdig afsterven van de embryo of tot een kind met een ontwikkelingsstoornis (b.v. bij het syndroom van Down is er één exemplaar te veel van de kleinste chromosoom) en, 2) een niet ontvankelijke baarmoederwand, waardoor de embryo niet goed kan innestelen.</p> <p>In tegenstelling tot andere proefdieren, zoals muizen, vertonen paarden een sterk vergelijkbare verminderde vruchtbaarheid (15% van de merries) als bij vrouwen. Net als bij mensen is drachtverlies meestal het gevolg van vroege embryonale sterfte door aneuploidie of een niet reagerende baarmoederwand. Dit is de reden waarom paarden een geschikter en 'natuurlijker' diermodel zijn om deze vruchtbaarheidsproblemen te bestuderen.</p> <p>De doelstellingen van het voorgestelde project zijn:</p> <p>(1) De focus van deel 1 ligt op het vinden van stoffen betrokken bij het evenredige verdeling van de chromosomen tijdens de eicelrijping en de eerste celdelingen bij de vroege embryo. Er wordt vooral gekeken naar de foutgevoeligheid van deze processen en of het ontbreken van de nodige stoffen inderdaad leidt tot een verkeerde aantal chromosomen in de cellen van de embryo</p> <p>(2) Deel 2 focust op de uitwisseling van stoffen tussen de vroege embryo en de baarmoederwand in voorbereiding op de innesteling. Er wordt gekeken naar specifieke signalen afgegeven door de embryo en vervolgens in hoever deze stoffen een rol spelen bij het ontvankelijk worden van de baarmoederwand. Anders om, wordt gekeken hoe stoffen afgegeven door de baarmoederwand de levensvatbaarheid en ontwikkeling van de embryo kunnen beïnvloeden.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas	<p>Het opsporen van stoffen of mechanismen betrokken bij chromosoom verdeling in paardeneicellen en embryo's, en hoe een tekort aan deze stoffen of fouten in de mechanismen kan leiden tot ontsporing van de delingsproces, zal de basis vormen voor het ontwikkelen van toekomstige strategieën of behandelingen om chromosoomdelingsfouten te voorkomen tijdens een IVF behandeling. Een vermindering van deze verdelingsfouten zou de kans op een normale embryo, en daardoor op een levend geborene na IVF-behandeling, aanzienlijk verbeteren bij zowel paarden als mensen. Meer inzicht in de oorzaken van foutieve chromosoom verdeling zal ook gebruikt worden om te verklaren waarom toenemende leeftijd of het invriezen van eicellen bij de vrouw en de merrie leidt tot een aanzienlijke stijging in de risico op chromosoomdelingsfouten met de vooruitzicht om ook hiervoor behandelingsmogelijkheden en verbeterde invriestechieken te ontwikkelen.</p> <p>Een betere kennis van de stoffen betrokken bij de voorbereiding van de baarmoederwand op de innesteling van het embryo kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe strategieën om het</p>

worden bereikt nadat het project is afgerond).

percentage succesvolle ingenestelde embryo's bij merries met verminderde vruchtbaarheid te verhogen. Onder andere zou deze kennis helpen bij de selectie van de optimale moment in de cyclus om een embryo terug te plaatsen in de baarmoeder. Verder zou de identiteit van de stoffen gebruikt kunnen worden als basis voor diagnostische testen om aan te geven of er sprake is van een ontvankelijke baarmoeder; als er bewijs is voor een niet ontvankelijke baarmoeder, zou er verder gekeken kunnen worden hoe dit geholpen kan worden. In andere woorden, deze kennis zal leiden tot het ontwikkelen van therapieën om de ontvankelijkheid van de baarmoeder te verbeteren.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Vijf-en-estig merries (13 per jaar; maximaal 1 jaar per merrie) zullen worden gebruikt voor:</p> <ul style="list-style-type: none"> - het winnen van eicellen uit de eierstokken (30-45 minuten inclusief voorbereiding). Dit kan uitgevoerd worden op een willekeurige moment zonder het gebruik van hormonen. Eicel winning wordt bedreven door een echo sonde en naald ingebracht door de schede. Er zal 155 keer eicellen gewonnen worden in de loop van de 5 jaar; niet meer dan 6 keer bij een individuele merrie. - kunstmatige bevruchting door inbrengen van sperma via de baarmoedermond; dit is een behandeling dat 5- 10 minuten duurt en ongeveer 70-75 keer uitgevoerd gaat worden (maximaal 8 keer bij een individuele merrie). - het injecteren van medicijnen om de cyclus te verkorten/eisprong op gang te brengen. - echo van de voortplantingsorganen - Endoscopie (kijkoperatie) van de baarmoeder. De endoscoop wordt door de baarmoedermond binnengebracht om zodoende gericht monsters te kunnen nemen van baarmoeder vloeistof. Dit is een ingreep van 30-45 minuten en zal 100 keer uitgevoerd worden. Hiervoor geldt ook dat het niet meer dan 6 keer herhaald zal worden bij een individuele merrie. - Embryo's spoelen uit de baarmoeder en embryotransplantatie naar een draagmoeder. Embryo's worden uit de baarmoeder gespoeld met behulp van vocht, in en uit gebracht door een flexibele slang. Dit proces duurt ongeveer 30 minuten en zal 70-75 keer uitgevoerd worden (maximaal 8 keer per individuele merrie). Embryo's worden getransplanteerd via een rigide pipet ingebracht door de baarmoeder mond. Dit behandeling duurt 10 minuten en zal 45-50 keer worden uitgevoerd (maximaal 6 keer per individuele merrie).
---	--

<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De merries worden via de endeldarm (uiteinde dikke darm) gevoeld. Er wordt op specifieke momenten in de cyclus of dracht handelingen uitgevoerd die samenvallen met kunstmatige bevruchting of het volgen van de zwangerschap. Voor eicelwinning gaat men bij een verdoofd dier met een naald de buikholte binnen, om enige ongemak te minimaliseren wordt bij deze ingreep gebruik gemaakt van een ruggenprik. Dit zijn gangbare handelingen die ook in een dierenkliniek worden uitgevoerd en veroorzaken een licht voorbijgaand ongemak.</p> <p>Eicel winning kan bij ongeveer 20% van merries leiden tot lichte pijn dat iets langer aanhoudt (24-48 uur). Als er sprake is van langer aanhoudende pijn, worden de merries met extra pijnstillers behandeld en zullen ze uitgesloten zijn van toekomstige eicelooft pogingen.</p> <p>Tijdens kunstmatige inseminatie wordt sperma door middel van een rigide pipet handmatig in de baarmoeder van de merrie gebracht, via de vagina en baarmoedermond. Voor Embryo transplantatie wordt een dun slangetje in de baarmoeder gebracht en wordt de baarmoeder een drietal keer gespoeld met 1 litre fysiologisch vloeistof. Voor beide ingrepen hoeft de merrie neit verdoofd te worden is het niet aannemelijk dat het nadelige effecten zal hebben.</p> <p>Om de dag 14-28 embryo's te verzamelen wordt gebruik gemaakt van een flexibele endoscoop (camera) om de binnenkant van de baarmoeder in beeld te brengen. Hiervoor moet ook lucht in de uterus ingeblazen worden; omdat het insuffleren van lucht licht ongemak kan verzorgen wordt de merrie verdoofd. Er zijn verder geen nadelige effecten te verwachten. Er wordt ook een biopie van de endometrium (baarmoeder slijmvlies) gewonnen. Dit wordt door middel van een biopie tang gedaan. Als gevolg kan de baarmoeder licht gaan bloeden. In de regel houd dit vanzelf snel op. Heel af en toe blijft het wondje iets langer bloeden waardoor er wat bloed in de baarmoeder opstapelt. Dit gaat vanzelf over en de merrie zal er weinig van merken.</p>
--	---

<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae)</td> <td>65</td> <td>0</td> <td>52</td> <td>13</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae)	65	0	52	13	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae)	65	0	52	13	0												

<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd				
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren											
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									

Paarden, ezels en kruisingen
daarvan (Equidae)

10

0

55

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

Deze procedures hebben geen blijvende effect op de gezondheid of vruchtbaarheid van de merries. Aan het eind van elke jaar van het project gaan de 13 ingezette merries terug naar de draagmoeder koppel. Voor commerciële embryo transplantatie worden merries die niet voor de sport of de recreatie ingezet kunnen worden, ingezet om de embryo van een waardevolle fokmerrie te dragen. Dit houdt in dat de draagmoeder de embryo van een donormerrie (eigendom van een cliënt) zal ontvangen, de dracht volbrengen en het veulen groot brengen; in de regel is dit een traject van 18 maanden. In de eerste period lopen de merries samen in een groep; op 6 weken van de dracht worden ze opgehaald door de eigenaar van de embryo. Vervolgens verblijven ze bij de tijdelijke eigenaar to dat het veulen gespeend wordt (6 maand oud). Daarna keren de merries terug na de draagmoeder koppel. In de regel ontvangt een dergelijk draagmoeder één keer in de 2 jaar een embryo, tot een maximale leeftijd van 16 jaar.

In sommige gevallen zullen de merries worden hergebruikt voor andere experimenten of verkocht aan particuliere paardeneigenaren.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Idealiter zou het proces van chromosoomdeling bestudeerd worden in humane eicellen. Echter dit kan niet op ethisch en wettelijke (embryowet) gronden. Verder zijn eicellen zeer groot en complexe cellen die niet zomaar door middel van gangbare kweektechnieken buiten een levende dier gemaakt kunnen worden. Om de chromosoomdeling bij normale, levensvatbare eicellen te kunnen studeren, moeten deze eicellen dus geogoste worden van levende dieren.

De processen van embryo ontwikkeling en innesteling zijn (nog) niet in een reageerbuis na te bootsen. Een van de doelen van dit project is om kweek technieken voor baarmoedercellen te ontwikkelen waardoor er in de toekomst een deel van de innestelingproces wel in het laboratorium bestudeerd kan worden.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Bij paardeneicellen en embryo's is het risico op chromosoomdelingsfouten relatief hoog, bijvoorbeeld in vergelijking met de muis. Dit maakt het mogelijk om chromosoomdelingsfouten met minder monsters/dieren te bestuderen in tegenstelling tot andere proefdieren waarbij chromosoomdelingsfouten in eicellen en embryo's zeldzaam zijn (bijvoorbeeld knaagdieren).

De gebruikte technieken zijn veilig, niet schadelijk voor het dier en veroorzaken slechts een voorbijgaand licht ongemak. Ook wordt de vruchtbaarheid niet beïnvloed. Daarom kunnen deze procedures veilig bij hetzelfde dier worden herhaald. Op deze manier kan het totaal aantal gebruikte dieren beperkt worden.

Wat betreft de chromosoomdeling is de betrokkenheid van een aantal eiwitten bij de delingsmechanisme al bewezen bij kankercellen. De aanwezigheid van dezelfde eiwitten in eicellen is ook al aangetoond in een pilot experiment.

Voor de signalen betrokken bij de innestelingsproces zal de focus liggen op de samenstelling van kleine deeltjes losgelaten door cellen. De aanwezigheid van deze deeltjes is reeds aangetoond in de baarmoeder vocht van de merrie. Omdat het gaat om een kwalitatief benadering (verschillen in aanwezigheid), kan het aantal dieren/monsters per groep beperkt blijven.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Alle gebruikte dieren zullen in sociale groepen worden gehuisvest, waarbij er speciaal op gelet wordt dat elk dier voldoende omgevingsprikkel (verrijking) en bewegingsmogelijkheden krijgt. Bovendien zullen de merries tijdens de acclimatisatieperiode worden getraind met behulp van positieve conditionering voor de procedures die zij zullen ondergaan (bijvoorbeeld tijdens inwendig onderzoek). Angst of lijden zal tot een minimum worden beperkt door de dieren in twee of drietallen in aangrenzende onderzoekstallen te plaatsen, en afleidingstechnieken te gebruiken. Verder worden verdovingsmiddelen en pijnstillers ingezet indien we dat van toepassing vinden, zoals we dat ook in de kliniek gewend zijn.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Onze onderzoeksgroep beoogt de studie van fouten leidend tot gefaalde chromosoomdeling bij paardeneicellen en embryo's, en van de communicatie tussen embryo en het moederdier in volwassen dieren (4-16 jaar oud). Het paard is voor beide onderwerpen een goede model voor de mens. Wat betreft eicelontwikkeling maakt de merrie slechts één follikel per cyclus en heeft de cyclus een duur van 21 dagen; beide zijn vergelijkbaar met de cyclus bij een vrouw. Chromosomale afwijkingen (aneuploidie) is bij zowel paard als mens verantwoordelijk voor meer dan 50% van alle vroeg embryonale sterftes, en in beide soorten is embryonale sterfte een vaak voorkomende probleem. De risico op embryonale sterfte neemt bij zowel paard als mens toe met toenemende vrouwelijke leeftijd. Wat de innesteling proces betreft, zijn de voorbereidende stappen

(preimplantatie fase) bij de merrieuitzonderlijk lang (42 dagen). Bij de merrie is innesteling ook niet invasief, dit betekend dat een embryo niet chirurgisch verzwemd kan worden zonder contaminatie met maternale cellen. De eerste stappen in de innestelingsproces (waarin de embryo in contact komt en vervolgens vast hecht aan de uteruswand) hebben veel overeenkomsten tussen grote zoogdieren (waaronder paard en mens). De lange pre-implantatie fase en niet invasief implantatie maken de merrie een goede dierenmodel om preimplantatie processes te bestuderen. Merries die jonger dan 3 jaar en ouder dan 16 jaar zijn, hebben minder follikels beschikbaar waaruit een eicel kan geoogst worden. Als er oudere of jongere merries gebruikt zou worden, zouden we meer merries moeten gebruiken om eenzelfde aantal eicellen te verzamelen.

Merries die ouder zijn dan 16 jaar kampen eveneens met een leeftijd gerelateerde baarmoederdegeneratie, waardoor hun vermogen om de dracht te behouden afneemt. Dit zou in kunnen houden dat de baarmoedercellen bij oudere merries minder in staat zijn om de stofjes die wij willen bestuderen af te scheiden.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--