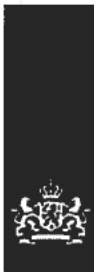


Inventaris Wob-verzoek W17-07									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS2017822	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x		x	x	
8	DEC-advies 1				x		x	x	
9	Verzoek om nadere aanvulling CCD - DEC				x		x		
10	DEC-advies aangevuld				x		x	x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x		
12	Verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x	x	
13	Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x		



18 JAN. 2017

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 <input type="checkbox"/> 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	9713AV Groningen
		IBAN	NL45ABNA0474567206
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 4 - 1 - 2017 |
| Einddatum | 31 - 3 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Aanpassing van trekvogels aan klimaatsverandering
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] 9713 AV Groningen |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-


6 Ondertekening

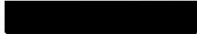
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

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 16 - 01 - 2017 

Handtekening 



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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the ‘Netherlands Food and Consumer Product Safety’
- 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
- 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.

Climate change is one of the big challenges of this era, affecting almost all organisms on the globe. Some species may thrive at higher temperatures, whereas others may have difficulties to adjust. This project is about how a species of long-distance migrant, the [REDACTED] may adjust to climate change by a diversity of possible mechanisms.

Through our work in the past, [REDACTED] have become one of the flag-ship species for the ecological effects of climate change^{1,2}. They breed in temperate and boreal forests, where they arrive shortly before the breeding season after a rapid migration from wintering areas in West-Africa³. Timing is at a premium, because as insectivorous species they rely on insects, and arriving too early likely kills them from starvation. Arriving too late is also detrimental, because for the best breeding output they should synchronize their nestling period with the short period when insects (primarily caterpillars) are abundant in these forests⁴. They thus have a small window of opportunity, and the timing of this window depends strongly on temperature. Higher temperatures allow earlier arrival because insects for adults are available, and optimal breeding dates are earlier because of the early nestling food peak⁵. We know that climate change has advanced this peak in food availability, and flycatchers have responded by advancing their laying date, but insufficiently and increasingly breed too late to profit from the food peak. As a result, we showed that the penalties for late breeding increased (and hence selection for early breeding strengthened)⁶, and that at a local scale flycatcher populations declined strongly in areas where food peaks were early and the birds were unable to adjust². We did not just show this for the Netherlands, but also combined work in various European countries, showing that local climate change experienced between breeding areas differed, and that the birds' response was highest in areas with most warming⁷. This research has been influential in the media and public debate as one of the prime examples of how climate changes affected animal populations (e.g. use in Al Gore's documentary, covered by Time Magazine etc).

The hypothesis why these birds could not adjust better is that they have no knowledge at the wintering grounds when spring starts at their breeding grounds, some 5,000 km away. Hence, they cannot anticipate on these advancing spring circumstances as a result of climate change, and depart from their wintering ground at their internal timing, which is based on their internal clock⁸. This presumed hard-wired timing thus prevents a rapid adjustment, but interestingly, we do observe an ongoing advance in breeding and arrival dates over the last three decades. **In this project our major question is how this advanced timing of the annual cycle is caused, and what the potential limits are for ongoing adjustment in the future?** We aim to address the role of phenotypic plasticity within individuals, dispersal to other habitats, and local evolution on genetic variation on timing mechanisms. Studies on adaptation do require such an integrated approach, but it also means that we are making many, but integrated steps within this project. The results of this study will be important in predicting the ecological consequences of climate change, and the public awareness around this theme.

[REDACTED] are easy birds to work with, since they readily breed in artificial nest boxes. [REDACTED] have a very large range and population size and thus are least concern according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN). They can be caught in these nest boxes with relatively low disturbance (no nest desertion, and parents resume feeding their nestling quickly after being caught). [REDACTED] have been studied over more than half a century at some place in Europe, and we have data on laying dates, reproductive success and population dynamics from about 20 sites across their breeding range⁷. Our research group has established a nest box breeding population in 2007, and annually between 300-350 pairs are breeding there in 1100 nest boxes supplied⁹. We have ringed all nestlings and parents, and collected data on timing traits like spring arrival dates and laying and hatching dates of all individuals. We know that arrival dates are repeatable within individuals⁹, and using our pedigree, we estimate that heritability of arrival date is around 25% which means that 25% of the observed variation is additively inherited (unpublished data). Note that spring arrival is a behavioural trait that likely is strongly affected by environmental components (e.g. weather en route), and therefore this 25% is surprisingly high.

[REDACTED] reside most of the year at their wintering grounds. In recent years we have gained an enormous knowledge on their migration and wintering grounds, from tracking them individually with geolocator loggers^{3,10,11}. These tiny data loggers (ca 0.5 g) record light levels throughout the year, and

after return these loggers must be taken off the bird and data downloaded. The estimates of day length obtained can be used to estimate latitude and longitude throughout the year, and hence give the approximate track to and from the wintering grounds. These data revealed that the Drenthe breeding flycatchers winter in a rather restricted area in Western Ivory Coast¹⁰, that spring migration was fast³, starting with a non-stop flight crossing the Sahara¹¹, and arriving ca 14 d after departure in the breeding areas. These data also showed that variation in arrival dates in spring are mostly explained (>90%) by departure date³. Together with the relatively high repeatability and heritability of spring arrival dates, this suggests that genetic variation in departure dates is present, and if conditions during migration are good this heritable variation is also expressed in arrival dates. However, we do not know whether this heritable variation is truly genetic, or that ontogenetic processes play a major role as well. Candidate genes for circannual timing are available, but not yet tested within this study system. Knowledge on the genetic basis of the variation and the causal timing mechanisms involved are necessary for interpreting and forecasting the potential and limits of adaptation.

One way for adjustment for individuals that become locally maladapted is to disperse to another habitat that fits their specific requirements better¹². In our system this could mean that if individual arrive too late at their former breeding grounds, they can continue to migrate northwards where spring starts earlier (or closer by habitats with later phenology). This phenotype-habitat matching could have great benefits for the individual, but more importantly, it may speed up evolutionary change, if these immigrants introduce new gene variants (for early annual cycles) for selection to act on. However, two potential caveats exist: (1) dispersal may also have major costs, and therefore dispersers may not contribute a lot to the local population, (2) timing of the annual cycle may not be genetically different in this northern population, and young raised here behave similar as the native population, and therefore the evolutionary potential is non-existent. Therefore one of our aims is to reveal the costs and benefits of dispersal¹³, as well as the causes of variation in annual timing between populations.

Dispersal thus seems an important way to adjust to spatially and or temporally heterogeneous conditions. Interestingly, wild populations reveal instead that high dispersal propensity is far from being the norm. Compelling evidence exists that in many taxa individuals of the same population differ consistently in their dispersal propensity and that dispersers are non-random sub-sets of populations (dispersers are usually more aggressive and bolder while non-dispersers are usually less aggressive and shy)^{14,15}. The association between dispersal propensity and other behavioural traits is called "dispersal syndromes" and is supposed to be adaptive (e.g. being aggressive may help colonizing new areas). As we want to understand the role of dispersal in adaptation, we need to include these linked behaviours as well, as these likely determine dispersal success. Therefore, we also aim to understand why individual variation in dispersal syndromes exist within-populations, whether it plays a role in adaptation to environmental changes and whether dispersal to northern latitudes can be a viable option to adapt to global warming.

To answer these fundamental questions related to annual cycle adaptation to climate change at a relevant spatial scale and including dispersal as process, we need to artificially disperse individuals to sites at various distances. Subsequently, we aim to measure how they perform here with respect to behavior (aggressive vs. less-aggressive) and associated fitness consequences of living in a different habitat. Simultaneously we will study the annual cycle timing of the new generation raised in either the old or new habitat, to know what mechanisms are responsible for annual cycle adaptation. Therefore, we plan to experimentally mimic short- and long-distance dispersal in [REDACTED] by translocating adult birds and eggs to new sites within the Netherlands and from the Netherlands to Sweden. We will further use geolocation for tracking movements over the annual cycle of a subset of birds, and take a set into captivity to study annual cycle variation under controlled conditions. Both translocation experiments^{13,16} and tracking with geolocation³ have been already successfully conducted in this population.

Translocating individuals within the Netherlands and individuals and eggs between the Netherlands and Sweden in combination with tracking will illuminate whether the capacity of populations to adapt to climate change rely on specific individuals (e.g. aggressive types), whether population differences in seasonal timing are due to genes or not, and allows studying the fitness consequences in the wild.

We want to emphasize that understanding adaptation requires a good knowledge about the ecological conditions individuals are experiencing during the year. Food is one of the foremost ecological factors, but seldom studied in detail as it is labour intensive to study both diet choice and food availability. Currently we have started to use molecular tools to estimate diets from DNA remains of prey in faeces, through DNA-barcoding. We make good progress, but need to calibrate the technique to compare the

food ingested and the DNA-remains being excreted. Since we will keep [REDACTED] [REDACTED] in captivity, we aim to use these to feed them several diets consisting of different frequencies of insects, allowing to calibrate this promising method.

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]
4. [REDACTED]
5. [REDACTED]
6. [REDACTED]
7. [REDACTED]
8. Gwinner, E. *Ibis* **138**, 47-63 (1996).
9. [REDACTED]
10. [REDACTED]
11. [REDACTED]
12. [REDACTED]
13. Burger, C. *et al. PLoS. One.* **8**, e83176 (2013).
14. Duckworth, R. A. & Badyaev, A. V. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 15017-15022 (2007).
15. Duckworth, R. A. & Kruuk, L. E. *Evolution* **63**, 968-977 (2009).
16. [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?

Our main goal is to understand how and by what mechanisms migratory birds can adapt their annual cycle to climate change, and predicting what the limits of adaptation are. To reach this goal there are six different sub-goals, and for each of these goals we mention briefly how we will tackle this question.

1. Phenotypic flexibility in the annual cycle of adult birds: using geolocator loggers on same individuals over multiple years
2. Estimate the genetic variation within populations
3. Distinguish genetic and ontogenetic causes of variation between distant populations
4. The role of dispersal in adaptation to environmental change
5. Investigating the limits of annual cycle adaptation to climate change, by revealing timing mechanisms
6. Understanding the ecological background of adaptation through diet studies.

This integrated program combines three separate competitive grants (2* ALW-NWO, one RuG grant obtained through an internal competition), which were all reviewed by specialists in the field whom we convinced about its feasibility.

3.3 Relevance

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

Our project proposes to study the role of dispersal syndromes in the adaptation processes to large scale environmental changes. Because we will embrace this question using innovative and integrative methods applied to a model species for ecological effects of climate change, we believe that the results of this project are of general interest to a diverse array of research fields and organisations.

- Conservation Biology: Climate change is one of the biggest threats to ecosystems and species in

modern time. The success of conservation decisions greatly depends on our knowledge of species abilities to disperse and adapt to new habitats. However, our knowledge is limited to few existing translocation studies on small oceanic islands. The proposed research may have a clear impact on nature management decisions and the protection of biodiversity (e.g. improvement of landscape connectivity, reintroduction) and can have direct benefits for the field of conservation biology and conservation NGOs.

- **Evolutionary ecology:** It has only recently been fully realized that evolutionary and ecological processes can play at similar time scales, and hence that ecological research should not just consider species as static but rather as changing entities. This pleads for a strong integration between evolutionary and ecological studies, and this project fulfills that role. Relatively little proof for evolutionary change in natural populations exist in which the ecological causes of selection are being determined, and again, this study will contribute to this void.
- **Spatial sciences:** Our study will increase knowledge on how animals disperse and use heterogeneous environments and how they react when exposed to new environmental challenges. This knowledge will be useful for researchers (e.g. new collaborative Sustainable Landscape Competence Centre) and environmental consultancies involved in landscape planning, sustainable development and ecological impact of human-driven environmental changes.
- **Personality psychology and human personality:** dispersal strategies are linked to individual personality in humans (e.g. Jokela et al. 2008, *Psych. Sci.* 19, 831-837). However, studies on animal personality have the advantage that hypotheses can be tested via direct experiments: our project allows manipulating local populations and investigate how different aggressive types are affected by their social and non-social environment which will be of great interest to understand variation in dispersal behaviour in humans.

We have been active and very successful in bringing our work to the media in the past, and will continue doing this. We have already made contacts with the Dutch TV program Vroege Vogels who want to film the translocation experiment and broadcast this.

3.4 Research strategy

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

Our main aim is to understand and predict annual cycle adaptation to climate change in long-distance migrants, with an emphasis on the following aspects: phenotypic plasticity, ontogenetic effects, local evolution and dispersal to better places. Our strategy is to combine detailed measurements that we can do in the field, with a large ongoing descriptive project to test how the population is responding to ongoing climate change, how heritable traits are, whether dispersal is important, and how timing and dispersal are related to other behavioural traits into dispersal syndromes. This descriptive work within our breeding population needs to be extended by tracking of individuals when migrating to and from Africa where they winter, and therefore we have been using ultra-light weight geolocator loggers, and aim to continue this to estimate the amount of phenotypic plasticity in these traits, and to couple genetic variation as measured from the pedigree translate into variation of the whole suite of timing traits during the entire annual cycle.

To better understand the possible ways of adaptation, we aim to force individuals into different circumstances and measure indeed whether this offers a solution for birds that become locally maladapted when the climate keeps on changing. For this, we aim translocating adult females to southern Sweden, to mimic dispersal to a breeding habitat with later timing, and study their reproductive success there, relative to controls in the Netherlands and Sweden that only have been translocated over a short distance. As it is known that individuals within populations often vary in dispersal propensity and that this is linked to other behavioural traits that are supposed to increase settlement success in new habitats, we will measure other behaviours as well (mainly aggressive responses to a potential competitor) to understand whether these syndromes are important in this process of adaptation by dispersal, and/or whether individuals change their behaviour when being forced to breed somewhere else.

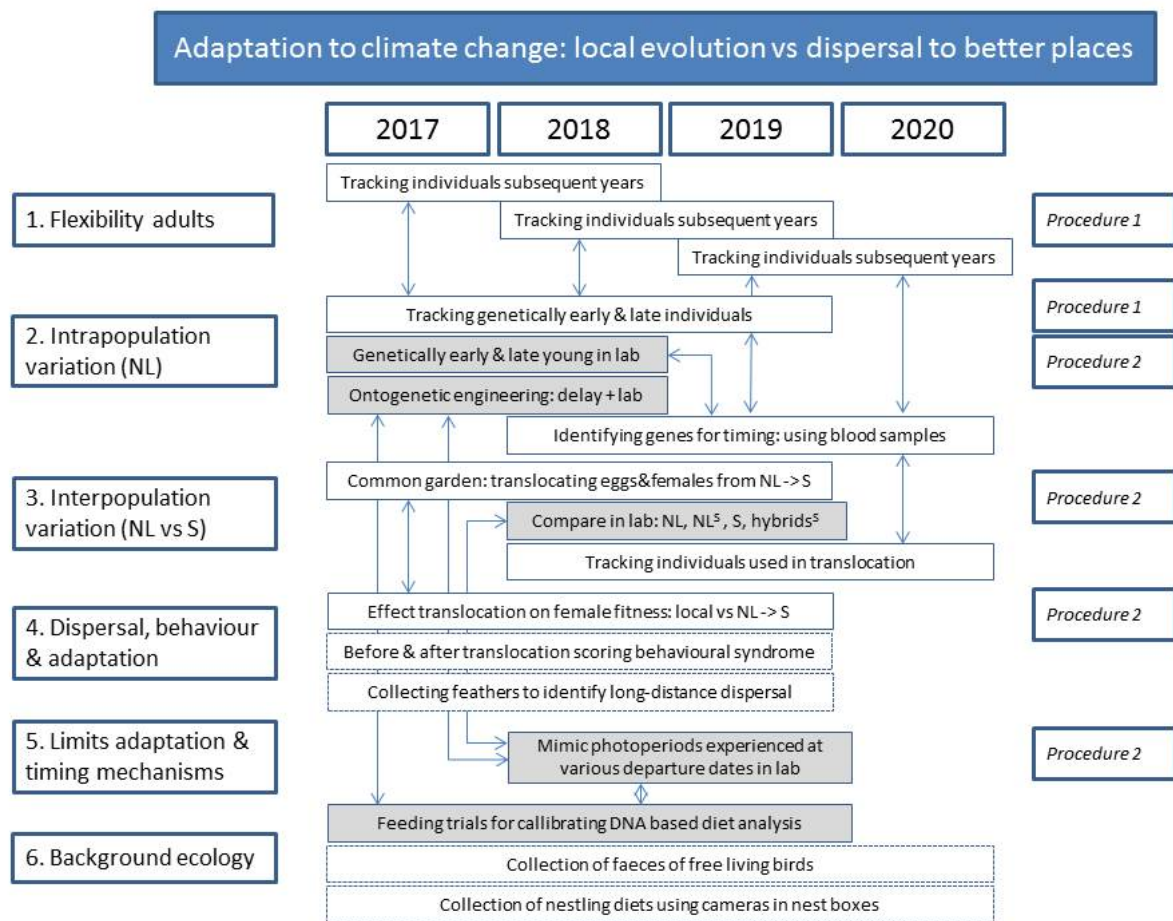
The evolutionary consequences of dispersal to northern latitudes only are important, if timing of the annual cycle has a major genetic background. Alternatively, ontogeny may be very important, and Swedish populations migrate and breed later than e.g. the Dutch because they were raised under the specific Swedish conditions. Therefore we want to compare annual cycle timing within a common garden experiment, with in Sweden young growing up with a pure Dutch background (translocating eggs, being

raised by Swedish parents), a pure Swedish background (local born chicks), and hybrid chicks (Dutch females translocated and paired with a Swedish male). We will follow the fates of chicks in the wild, by putting geolocator transmitters on them to see where they winter, and when they migrate, again giving insight also in the ontogeny and genetic effects determining migration. We aim to include a molecular genetics approach, identifying which candidate genes are associated with migratory timing, both in the wild and in the lab.

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.

Below we have depicted our research goals and the experiments involved, and how these are linked to each other. The grey boxes show the lab experiments, the white boxes the field experiments, and the white boxes with dashed borders are measurements that we think are formally no animal experiments. Also subproject 6 is formally not an animal experiment, but for completeness we want to illuminate how our other measurements are rooted into an ecological research context.

Roadmap of the project



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.

We have tried to describe the coherence of the different components already above. Here the different steps

- (1) Individual plasticity of migratory timing will be described with geolocator deployment of individuals in two subsequent years. We will select individuals that were born in the area, and that have an estimated early or late breeding value of spring arrival date (i.e. estimate of genetic component in variation from pedigree analysis, which results of our monitoring program since

2007). We are interested in the consistency of traits like winter habitat selection and timing within individuals among years, but also how these are affected by environmental conditions encountered at the wintering grounds or during migration. Therefore, we aim to carry this out in at least four years to capture a range of environmental conditions.

- (2) Next we are interested in why within populations some individuals are early and others are late in their annual cycle, and also why northern populations are later than southern populations. For this reason we (1) analyse pedigree effects for heritability, (2) manipulate hatching date by delaying eggs to see whether there is an ontogenetic effect, (3) do the translocation females/eggs between populations to create a common garden experiment with variation in genetic background.
- (3) A rather small sample of these delayed/translocated young birds are kept in captivity, to measure the timing of their migratory activity without "ecological noise" (which is measured as nocturnal restlessness, as these birds are nocturnal migrants, and become active at night if they would normally migrate). After birds start their nocturnal spring migratory behaviour, we will test whether a very early start of migration will hamper the migratory behaviour, because if birds would start very early (i.e. around 1 March) they will experience at first a shortening of the day length when migrating north. As it is well established that photoperiodic cues are crucial in determining onset of migration, it could well be that a reduction of photoperiod disrupts migration, and hence sets a limit to advancing migratory behaviour even when needed to meet the necessary adaptation to climate change.
- (4) Young from translocated eggs/females and controls will be followed during their live. We will do so by monitoring their arrival dates later in life, and when returning as adults to equip them with geolocator loggers. This will only be achievable for a rather small sample size (because of probability of return first year * probability to return with loggers one more year later), and misses out on how migratory behaviour develops during ontogeny. Therefore we will try out to equip a group of juveniles with geolocators.
- (5) As we are convinced that studying single traits in evolutionary ecology is often too simplistic, we also incorporate the ideas about dispersal syndromes (animal personalities), as often genetically linked traits. For this, we want to screen the aggressive behaviour of pairs before and after 'forced' dispersal to study whether the aggressive behaviour of successful dispersers commonly observed in nature is the cause or the consequence of having dispersed. It is still unknown if birds are able to colonize new areas because they are more aggressive and can compete with other individuals/species already present (cause) or because they increase their level of aggressiveness in new areas (consequence). Identifying the exact mechanism is crucial to understand adaptation processes to environmental changes (like climate change). Furthermore to quantify the evolutionary consequences of individual variation in dispersal syndromes, we need to measure the performance of the birds (reproductive success and return rate) after translocation in new sites within the Netherlands. These results will provide new insight on the importance of individual variation in dispersal-related traits for animal population persistence through time. By repeating, short-distance translocation for two years, we will get high enough sample size to show significant patterns.

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	Tracking [REDACTED] with geolocators
2	Translocation and timing of migration
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



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. University of Groningen
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------------------|
| 1 | Tracking [REDACTED] with geolocators |

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.

This project aims at investigating the consistency and inheritance in migratory timing and the potential of (ontogenetic) phenotypic plasticity in response to environmental variation. To fulfil this aim we want to track adult [REDACTED] in two subsequent years, and track juveniles from different genetic backgrounds.

Adult tracking: in year t we catch the bird at the end of its nestling period and equip the bird with the lightest available geocator that runs for an entire year (but not heavier than 0.55 g; birds weigh on average 12.5 g). In the spring of year $t+1$ we retrap males with geolocators soon after arrival at the breeding grounds, and females when incubating their eggs (expected return rate is ~40% given our earlier work, which was not lower than the ~45% return rate of unmanipulated males). At the end of the nestling period we repeat the whole sequence again: catching, equipping with geocator and then retrapping the bird during the next year.

We select individuals with pedigree information, so that we can test whether individuals with a genetically early-pedigree signal also migrate earlier than individuals with a late signal. For this relationship with the pedigree we do not necessarily require the repeated measurement.

For the repeated measurements we are interested in how repeatable the different timing traits are among years, and how individual variation among years (i.e. degree of plasticity) can be explained (conditions at the specific wintering place, conditions encountered en route). We realise that sample sizes for the repeated tracks will be relatively low (expected percentage of two successful tracks is ~16%), but these will be highly valuable. Note that also single tracks are very valuable, as we link these to the pedigree-information, and still can link them to between individual variation in encountered conditions. Furthermore, we will build up a longer sequence of years with geocator data (data already available now for rather good sample sizes from 2014 and 2016 (returning in 2017). With four more years we can

analyse between year variation in climatic effects on variation in migratory behaviour encompassing the whole annual cycle, which has not yet been done in passerines.

Juvenile tracking: Our interest is how ontogeny and genetic differences determine the timing of migration, both within and between populations. For this reason we carry out experimental translocations (appendix 2), delay hatching and use natural variation in heritable timing variation (from pedigree analysis), and our interest is how this affects their actual migration and wintering habitat choice.

Descriptive work has shown that within our Dutch study population individuals differ consistently in spring arrival, and that this is heritable. Furthermore, we know that Swedish birds start their migration about 10 days later than Dutch birds, and also arrive later at their breeding sites. We want to find out:

1. Whether young from early genotypes as measured from the pedigree from their parents, initiate migration earlier than later genotypes under controlled conditions.
2. Do Dutch birds migrate earlier than Swedish birds because this is genetically determined, or is there also an ontogenetic effect? For this we compare pure Dutch young raised in the Netherlands and raised in Sweden, young from hybrid pairs raised in Sweden, and pure Swedish young raised in Sweden and in the Netherlands (see experiments under appendix 2).

We will be carrying out aviary experiments with birds in these treatments to measure the timing of their migratory restlessness under controlled conditions (see appendix 2), but we are even more interested how these differences develop under the natural environmental conditions.

We will collect a small drop of blood (<10µl) for returning individuals (for DNA), and two feathers (one tertial (newly grown prior to departure at wintering grounds) and one tail feather (grown at previous year's breeding/birth site) for stable isotope research (estimating habitat quality of wintering sites, and potential origin of immigrants).

Parameters in the analyses will be: date of autumn departure, route taken, wintering location (especially longitude, as latitudinal variation is small and more difficult to infer from these dataloggers), date of spring departure, date of spring arrival, migration speed. These all in relation to genotypic variation (from pedigree) and environmental variation (remotely collected, publicly available). Variation in alleles on functional genes related to migration (relating this to tracks). Variation in isotopic ratios of winter grown feathers in relation to wintering latitude and longitude.

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

The geolocators are small chips that record the duration of light and dark period throughout the year each 10 minutes, and records temperatures every four hours. These data allow determining the position of the birds with an accuracy of approximately 200 km. This accuracy is much better than anything else we have from outside the breeding season.

At the moment the lightest geolocator logger for sampling an entire year is 0.55 g, including harness (Intigeo-W50, Migrate Technology Ltd, Cambridge, UK). However, weights still drop progressively and a type of 0.3 g is on the market but still has a battery life just too short for whole annual cycle sampling. The expectation is that within this project we will be able to use lighter loggers than the currently available 0.55 g, and we will use the lightest logger that has a battery life of 11 month.

Attachment of the geolocator logger is done with a leg-loop harness, made of elastic band. This harness does not hamper the bird in flight and the geolocator fits well on the back of the bird, and is mostly covered with feathers, and hence not strongly compromising aerodynamics.

We will capture **adults** when their nestlings are 10-13 d old (fledging occurs around 15 d), in their nest boxes with a spring trap. When the parent is feeding its chicks the trap closes, and the bird is gently taken from the nest. Weight of the parent is taken, and if being heavier than 11 g we will attach a logger. Attaching a geolocator takes not more than five minutes, and earlier measurements in our population showed that [REDACTED] resumed nestling feeding after being fit with a logger.

The challenge for using geolocator loggers on **juveniles** is (1) to increase the local recovery rate as naturally only 8% of offspring returns to the natal site as breeders (because of dispersal), (2) to have full grown fledglings, that have reached their adult dimensions, otherwise the attachment of the loggers during the postfledging period may hamper their flight ability, and hence their survival.

We think we can solve both challenges by keeping the birds into outdoor aviaries in the forest (of at least 2*2*2 m dimensions) for four-five weeks after fledging. This has been done in the past in the closely related collared flycatcher⁴, and this boosted local return rates to 15-20%, likely because this helped the fledglings to survive through their most critical period, and second, that individuals imprinted on the area to return their next year. We will keep families in these aviaries, with their parents from the moment that their chicks are about to fledge (12-13 d age). Previous experience shows that parents quickly resume feeding their offspring when food is provided, and fledglings become independent here from their parents. At this stage we release the parents (i.e. when chicks are about 28 d old), and keep nestlings for two-three more weeks in the aviary. We thus want to release these birds after four-five weeks in captivity, when they have moulted their juvenile plumage into an adult plumage, with geolocators attached.

Recovering and removing the loggers: Each spring we monitor spring arrival of all individuals in our population on a daily basis. When we encounter a male with a geocator, we will capture him between 3-7 d after arrival when soliciting the nest box for arriving females. The logger is taken off the bird through cutting the harness material. At this moment we take a feather sample (for stable isotope research) and a small blood sample for DNA (<10µl). Within 15 minutes after capture the bird is released again. For females, we wait with logger removal until they are incubating, and then they can be easily taken from the nest and procedures are similar as for males.

We have carried out this approach previously for adults and compared return rates and arrival dates of individuals with and without geocator loggers. We did not find any statistical negative effect of the loggers on both traits, although return rates were slightly lower for logger birds¹. We do acknowledge that in years when circumstances during migration are severe, a negative effect of carrying a logger may be present.

Go-no go decisions: For adults: none, since we have clear experience that this can work.

For juveniles: (1) termination of the experiment if for whatever reason survival in the temporary aviaries falls below 90%. (2) if return rates of juveniles with loggers in the first year fall below 5% (often, young birds skip one breeding year, so we can recapture birds in their second year).

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]
4. Löhrl, H. *J. Ornithol.* **100**, 132-140 (1959).

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

We know from our previous work that the timing of autumn and spring migration (both departure and arrival) can be accurately assessed from these loggers, and that for one year we had a very strong correlation between spring departure from Africa and subsequent arrival in Drenthe ($r=0.94!$, $N=14$ returned individuals). This means that the technology works, and sample variance is rather low.

In our sampling scheme we have to include that at least 50% (and likely 60%) of the **adult** individuals disappears between tagging and recapture, mostly due to natural mortality. This is normally higher in females than in males (average local return rate 35% in females and 45% in males; female value likely be deflated through lower site faithfulness).

For juveniles with geocator loggers we cannot make estimates of their return rates in the proposed procedure. Any track of a juvenile will be new to science, since no tracks of small passerines in their first year have been published.

For the genetic effects (i.e. comparison with pedigree-estimates of heritable arrival date, and allelic variation on functional genes) we can use single observations, and by selecting a relatively large fraction in the tails of this distribution, we will regress timing traits measured against the calculated breeding value (~estimate genetic effect). Our expectation is of a clear positive slope, but potentially an interaction with year, as conditions during wintering and/or migration are hypothesized to modulate the

expression of the genetic variation into the phenotype. This may hint to phenotypic plasticity, but when measured between individuals this could also be caused by selective disappearance. Therefore we stress the importance of repeat-tracking of the same individuals in two consecutive years.

B. The animals

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

Species: [REDACTED] ([REDACTED] [REDACTED] This is our model for studying the effects of climate change, for which we have a wealth of background information. [REDACTED] [REDACTED] breed readily in nest boxes, and can be ringed and manipulated easily, without clear negative effects. We have built up our study population since 2007, with ~350 pairs annually. Our pedigree is world-class for a wild passerine, with >120 locally born individuals per year recruiting into our breeding population, of which phenotypes of both parents are known. We have been running quantitative genetic models (called animal models) successfully, which showed clear heritable variation in spring arrival timing. Experimental translocations have been successfully done, as have been the geolocator deployment.

Origin: wild individuals.

Life stage: we equip breeding adults from the breeding population and juveniles.

Estimated numbers:

We start each adult cohort with 50 individuals, of which 20 are expected to return after a year. These 20 will once again be deployed with a geolocator, and of these we expect 8 to be recaptured in the subsequent year. We are planning to sample three cohorts, which would involve 150 individuals, of which we will have 60 single tracks, and 24 double tracks.

These sample sizes are based on previous successful work with similar numbers, and with taking the right variation in estimated breeding values (including relatively more individuals from the tails) a positive correlation is hypothesized if variation in migration timing is heritable. We have little idea how strong the environmental components will be, and whether the years are going to be variable enough to pick this up. Previous work on the repeatability of spring arrival in our population did clearly show these annual differences, and therefore we consider it likely to pick these up with this sample size. Sample size here is a balance between the importance of including enough variation (as we are interested in variation!), the low expected level of discomfort, and the high costs of geolocator loggers.

For juveniles we start with 40 individuals in the first year, and decide in the subsequent year based on number of returning individuals whether we continue, and what sample size is needed.

Estimated number of offspring per group for different years:

Experimental treatment	2017	2018	2019
early genotypes, unmanipulated	20	0-30	0-30
late genotypes, unmanipulated	20	0-30	0-30

We start with a modest sample size of 20 individuals per category, and may increase (or decrease/quit) it in the second and third year. Whether we repeat this experiment in the third year depends on the outcomes from the first two years, and the variance observed.

We consider the first year successful if we recover 4 of the 40 geolocator loggers. Although this is a tiny sample size, no first year tracks of any passerine have been published, and therefore even this sample size will be publishable. This is even more so because siblings of these birds will be used for the lab experiments on migratory timing, allowing a comparison between lab-based timing and actual timing in the wild (see appendix 2).

Maximum number of animals used: 310 for using geolocator loggers.

We will be blood sampling each year ca 300 individuals for functional gene screening: 5 years: 1500 individuals.

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.

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: to study the mechanisms underlying population differentiation in timing and migratory behaviour, we need to study birds in their natural environment. Therefore, no replacement is possible.

Reduction: based on our database, we calculated that we will get about 24 repeat tracks over a period of four years. Reducing this sample size will reduce our statistical power to detect annual variation in how genetic and phenotypic variation is related. By keeping juveniles a short period in captivity, we think we can boost local return rates, and thereby reducing the sample size.

Refinement: stress is kept as minimum by keeping the handling time by experienced field workers as short as possible. We use the smallest possible geolocator loggers. They are being removed as quickly upon return to the breeding grounds as possible.

Having juveniles in captivity will boost their initial survival rate post-fledging, and birds will be better able to carry the logger because they have more experience in flying.

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

We will not equip birds during bad weather (too cold / rainy / too hot) to reduce handling stress to birds. Birds will not be used in the experiment if 1. their mass is < 11 grams upon capture (mean mass is ca. 12.5g for adults feeding offspring, but also varies during and between days) 2. they present any visible injuries or apparent signs of illness.

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.

There has been no work with geolocators on passerines over extended periods (multiple years) to establish how conditions (e.g. climatic effects) affect migration strategies, and especially not how this affects the translocation of a genotype into a phenotype. Repetition of such a procedure in multiple years is essential to understand the adaptive capacity of populations, as these are always related to environmental conditions. No other research has been performed on how juveniles develop their migratory behaviour, and how much of this is genetic or ontogenetic.

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

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

The animals live in their natural environment. We will keep flycatchers a couple of weeks in outdoor aviaries in the forest (see below).

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.

X Yes > Describe this establishment.

The experiment takes place in the wild under the responsibility of the license holder. Juveniles will be kept in an outdoor aviary for 4-5 weeks just after fledging. This complies with the Flora and Fauna-wet ontheffing of the University of Groningen.

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

We will house the individuals in the period after fledging as families in outdoor aviaries of 2x2x2 meter in the forest. Aviaries are checked twice daily on food availability, and animal wellbeing. We stimulate natural food to enter the aviaries by using a light-trap for nocturnal moths, and olfactory attraction (e.g. rotting fruits) for flying insects. This means that both young and adults can perform their normal behaviour and hunt for natural prey items. In addition, we provide high quality insect food.

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

There is the possibility that individuals carrying a geolocator can fly less long on the same amount of reserves. The reason is that they are slightly heavier, and energetic costs are determined partly by weight. However, we have observed 40-60 hrs non-stop flights over the Sahara desert in our flycatchers with geolocators in the past.

Explain why these effects may emerge.

Bad weather during migration.

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

Taking the lightest possible type.

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.

The possibility exists that the juveniles get injured in the aviary for whatever reason (broken leg, broken wing). In this case we will terminate birds by decapitation.

Indicate the likely incidence.

Not very likely.

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').

Mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

X No

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

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



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.	University of Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Translocation and timing of migration

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.

By manipulating individual dispersal over short (within the Netherlands) and long-distance (between the Netherlands and Sweden) we will gain new knowledge on the importance of dispersal in the process of adaptation to climate change. Translocation is a novel technique that can be applied to a restricted number of taxa including the [REDACTED] for which successful pilot experiments have been previously conducted. Following the behaviour (personality and timing) and the success (in terms of breeding success and survival) of the **adult birds** translocated to new areas will provide important information of which behavioural types (personalities) are better able to colonise new habitats and thus can help populations to adapt to fast environmental changes.

Our interest is how ontogeny and genetic differences determine the timing of migration, both within and between populations, and for this goal our interest is in **young raised in different environments**. For this reason we carry out experimental translocations, delay hatching and use natural variation in heritable timing variation (from pedigree analysis), and take offspring into the lab to measure their migratory restlessness. These birds are nocturnal migrants, and normally sleep at night, but when being in their migratory mood, they start to be active^{1,2}. This activity will be measured using cages where movements can be detected remotely. Our interest is in the timing (and especially the onset) of these movements, with the greatest interest in spring when birds need to migrate at the right moment to their breeding grounds.

Descriptive work has shown that within our Dutch study population individuals differ consistently in spring arrival³, and that this is heritable⁴. Furthermore, we know that Swedish birds start their migration about 10 days later than Dutch birds, and also arrive later at their breeding sites⁵. We want to find out:

1. Whether young from early genotypes as measured from the pedigree from their parents, initiate

- migration earlier than later genotypes under controlled conditions.
2. Whether there is an ontogenetic effect of hatching date: do chicks from eggs delayed for hatching migrate later than siblings not manipulated.
 3. Do Dutch birds migrate earlier than Swedish birds because this is genetically determined, or is there also an ontogenetic effect? For this we compare pure Dutch young raised in the Netherlands and raised in Sweden, young from hybrid pairs raised in Sweden, and pure Swedish young raised in Sweden and in the Netherlands.

The importance of including indoor measurements is that they can be made without any ecological confounding factors. But because we believe that ecology is extremely important in understanding this type of variation we aim to compare the patterns observed in the aviaries with patterns of individuals measured in the wild.

Furthermore, we aim to use the aviary birds for investigating how photoperiods experienced during the annual cycle may constrain the potential for adaptation to climate change. The rationale is that at present all flycatcher populations seem to start migrating to the north after mid-March, which means that they experience stable and mostly increasing photoperiods while migrating northwards. However, if climate change would continue to select for earlier arrival at the breeding grounds, birds may need departing as early as the beginning of March. If they do so, they would initially experience shortening of the photoperiod, as they migrate before the spring equinox, and we want to consider the possibility that this disrupts their migratory behaviour, and thereby sets a limit to adaptation of the annual cycle.

Parameters for translocation:

Establishment success of translocated individuals, in relation to aggressive behaviour.

Behavioural change before and after translocation

Reproductive success among treatments of translocated adults: laying date/ clutch size/ number hatchlings & fledglings/ fledgling condition/ nestling diet

Timing of annual cycle movements of young being raised in different environments (partly through geolocators (see appendix 1) and partly through observing spring arrival dates of untagged birds in the wild).

Parameters in captive birds: onset and duration of autumn migratory restlessness, onset and duration of winter moult, onset of spring migratory restlessness, progress of spring migratory restlessness.

1. Gwinner, E. *Journal of Experimental Biology* **199**, 39-48 (1996).
2. Coppack, T. et al. *Glob. Change Biol.* **14**, 2516-2522 (2008).
3. [REDACTED]
4. [REDACTED]
5. [REDACTED]

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

We plan on doing three types of translocation over three years (2017-2019): (1) short-distance adult (2) translocation long-distance translocation of adult females and (3) eggs:

- **Adult translocation:** To manipulate individual dispersal decisions, we will do short and long-distance translocation experiments (short: between sites within the Netherlands and long: between the Netherlands and Sweden). For that, we will use a protocol that has been developed and successfully conducted in our [REDACTED] population¹:
For the short-distance translocation experiment, established pairs will be caught at their nest box during nest building with a spring trap in the nest box or using mist nets in front of the nest box at our study sites. Both individuals of the same pair are normally captured within half an hour. Then they will be individually transported in small cages (ca. 20x15x18cm) and immediately released into an outdoor aviary (2x2x2m) built around a tree with a nest box in the new site (5 to 10 km away from their original breeding site). Food (mealworms & wax moths larvae), water and nest material will be provided *ad libitum* for 2 to 3 days (pair usually resumes nest building

activity within a day). The aviaries will be covered with double layers of mesh wire (13mm wide), to prevent predators to approach the cage too closely. Birds will be checked and fed daily. After this time period, the netting of the aviary will be opened to release birds without touching them and without removing the nest box. Food will continued being provided at the release site for more than a day to keep the birds attached to the local site. To keep disturbance at a minimum, we will leave the structure of the aviary *in situ* until the next day when it will be removed. A pilot experiment has revealed that >70% of the individuals stays at the new site after the aviary is opened. Control pairs will be exposed to the same procedure with the difference that the aviary will be built around their own nest box, to ensure that they experience the same amount of disturbance. We will also equip a camera in all nests of translocated birds when nestlings are day 9 or 10 old to measure diet brought by parents to their chicks³.

Behavioural scoring before and after short-distance translocation: To measure individual variation in aggressive behaviour (a commonly used personality essay in wild animals), we will conduct "simulated territorial intrusions" by placing a stuffed model of a great tit (*Parus major*), the main nest box competitor of flycatchers, together with playback songs (via a Mp3 player connected to a minispeaker) on the top of the nest box occupied by the focal flycatcher pairs. The devices are left for a maximum period of 15 minutes. If at least one member of the focal pair arrives within this time period and within a radius of 10 meters, an observer sitting quiet at a distance of 10 meters monitors the aggressive behaviour of the focal bird(s) for three minutes. The behaviours monitored include number of alarm calls, minimum approach distance to the stuffed model and number of attacks. The combination of these traits gives a measure of individual aggressive behaviour. Once the time period is over, all the devices are removed.

Each focal pair will be exposed to the stuffed model + playback for a total period of three minutes. To establish whether this individual measure of aggression is repeatable, we will expose each pair up to a total four simulated territorial intrusions (spread across the nest building and incubation periods) with a minimum interval of two days between tests. All tests will be conducted in the morning between 07:00 and 12:00.

For the **long-distance translocation experiment**, the same procedure as above will be followed except that only adult females will be captured and subsequently moved from the Netherlands to Sweden (Lund) by car during the night (550 km away). During the transport, females will be housed individually in small cages covered with cloth and provided with food and water. In Sweden the birds will be released into the same temporary aviaries, build close to a nest box where a wild male is singing. After the female is released in the aviary, we will capture this local male and release him in the aviary, creating hybrid pairs of Dutch females and Swedish males. This procedure has been successfully applied in a previous study, although then we brought complete Dutch pairs to Sweden. Many females during the previous experiment chose a Swedish male, and long-distance dispersal is most likely female biased in nature, and hence this procedure mimics better what happens naturally. It likely will increase the success rate of individuals staying as well, as this was 43% of the females after release in our previous experiment². Most importantly, we are largely interested in how chicks from hybrid pairs perform.

Go-No go decisions: we have ample and positive experience with this experiment, but a clear no-go would be for the translocation to Sweden when females do not pair-up with Swedish males (but again, in our pilot in 2010 this often happened).

- **Egg translocation:** To investigate whether population differentiation in annual timing and wintering grounds is due to genes, ontogeny or both, we will compare the behaviour of five groups of juveniles with different genetic background: (1) genetically Dutch individuals, born in The Netherlands and raised by Dutch parents, (2) genetically Swedish individuals, born in Sweden and raised by Swedish parents, (3) genetically Dutch individuals raised by Swedish parents (issued from translocated eggs to Sweden), (4) hybrids between a Dutch mother and a Swedish father, raised by Dutch females translocated to Sweden, and (5) genetically Swedish individuals raised by Dutch parents (issued from translocated eggs to The Netherlands). To create the experimental group 3, we will translocate Dutch individuals as eggs to Sweden: translocation will be done by collecting freshly laid eggs and store whole clutches cold in plastic

cups lined with cotton for a week before they are moved to Sweden by car. During transport overnight, eggs will be kept in their plastic cups lined with cotton in a cool box. The delay by keeping them cold does not compromise their hatching probability, and will align their hatching date more with the Swedish pairs, needed for incubation and nestling care. The removed eggs come from entire clutches, and we expect pairs to relay after their clutches are taken. Dutch eggs moved to Sweden will replace natural clutches of Swedish parents that care for them and these Swedish eggs are translocated to the Netherlands are raised by Dutch pairs. By doing so, we delay hatching by a week, in order to have a better match with the Swedish phenology, and the expected hatch dates of the nests of the translocated females. We have previously used such procedure to induce hatching delay of clutches in our [REDACTED] population and have shown that this does not affect hatching success significantly (control group=ca. 80% success, n=23, delay group=ca. 74% success, n=23)³.

Go-No go decisions: when hatching of the translocated eggs falls below 50% we first need to find out what the causes of this are, before continuation. Previous experiments in multiple years however has never lead to such low hatching rates.

Migratory restlessness in the lab for young individuals from experiments

We will be using young birds that are (1) either genetically early or late migrants as estimated from their parent's pedigree, (2) delayed hatching (early genotypes only), (3) translocated individuals (see above). Chicks will be raised initially in the field, until they are 13 d old (two days before fledging). When 13 days old we capture the parents and release pairs with their young in outdoor aviaries, where we provide food (mixture of high quality insect food, including fly pupae, wax moth larvae etc). From previous experience we know that parents continue feeding these offspring, until independence. Adults will be released when juveniles are 28 days old, or later if juveniles are still fed by their parents. Juveniles stay in these aviaries in the forest (see appendix 1) for two more weeks (i.e. when chicks are six weeks old). From each brood we then take one male and one female juvenile into the Animal Facility of the Center for Life Science of the University of Groningen, where they will be kept in outdoor cages until mid-July. (The rest of the juveniles is released with a geolocator logger (see appendix 1)). At that moment they will be brought to individual cages indoors at the Animal Facility, under natural photoperiods from either the Netherlands (individuals raised in NL) or southern Sweden (individuals raised in S). Individuals are kept in these individual cages (ca 100x80x80 cm) where we measure their migratory restlessness. This is their nocturnal movement (as measured remotely) which is a good indicator of natural migration in the wild. Twenty days after an individual has started its migratory restlessness (likely a month after being transferred to this cage), we will bring it to a large indoor aviary with photoperiod of the African wintering grounds (10° N). We house the birds here in groups of up to 20 individuals, with ad lib food. From the start of March we transfer individuals again to their individual cages where we measure migratory restlessness, again under African photoperiod. After the initiation of spring migration as measured by migratory restlessness, we will give half of the individuals a reduction in photoperiod, to mimic a photoperiod experienced when migrating well before the spring equinox. We measure the change in migratory restlessness before and after this photoperiod manipulations, as compared to control individuals.

Go-No go decisions: the major potential problem is keeping the birds healthy, which mostly depends on diet. If more than 20% of chicks die in the outdoor aviary, we will decide to release the other individuals with their parents. If more than 25% of individuals die during the period in captivity in the Animal Facility during the entire winter (Aug-April; natural mortality is ca 75% in the same period) we need to seriously consider how to better keep the birds, and may decide to quit this (captivity) part of the project.

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]

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

We have calculated our sample sizes based on the results of our previous pilots (translocation is successful for >70% over short distances and likely about 60% over long distances (when only doing females) and hatching success of removed eggs varies between 70-80%) and such that final sample sizes should be high enough to reveal significant effects of our experiments. In 2017-18 our Dutch samples are relatively bigger because in these years we are interested in the behavioural changes of experimental dispersal, but that project will cease, and therefore the Dutch control numbers drop.

In the aviary experiment are we interested in variation, and whether this variation within and between populations has a genetic and/or ontogenetic background. Therefore we use for our Dutch data individuals with a known pedigree, and consequently we can use correlation between the calculated breeding value (i.e. genetic value for the phenotype) and the onset of migration. The ontogenetic effects of delay can be studied within a family, reducing potential variation. Measurement error/variation of these lab based measurements of migratory restlessness was rather small in a homogeneous sample (SD of start spring migration ~8d, in sample of 7 individuals¹), and therefore we consider it likely that the proposed sample sizes will be reasonable. Sample sizes of the first year and the variance measured will be used for a better estimate in the second year.

1. Coppack, T. *et al. Glob. Change Biol.* **14**, 2516-2522 (2008).

B. The animals

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

Species: We chose the ██████████ (██████████) as a study model because we have knowledge on how this species is affected by environmental changes such as change in prey phenology due to climate change. This knowledge allows us to formulate hypotheses on how flycatchers can adapt to it and design novel experiments. Furthermore, this species is not endangered, readily breed in the nest boxes provided in our study site in Drenthe in high density (about 350 pairs per year), exhibits high level of individual behavioural variation (e.g. in dispersal and aggressiveness) and is relatively easy to monitor through time (thanks to individual rings or tracking). We can thus easily get a high enough sample size to answer research questions.

Origin: the wild. We will use eggs and birds breeding in the nest boxes of our study and eggs from a Swedish population. These two populations are 550km apart.

Estimated numbers:

Experimental group	Stage	# indiv	Captivity & duration	Other experiments	Blood sample
Translocation short-distance	Ad-pairs	250	Field, 3 d	Behavioural tests	Yes
Translocation long-distance	Ad fem.	100	Field, 3 d	None	Yes
Eggs local control	Eggs-1 st yr	40	Laboratory, year	Photoperiodic response	Yes
Eggs local delayed hatching	Eggs-1 st yr	40	Laboratory, year	Photoperiodic response	Yes
Eggs to Sweden, all delayed	Eggs	500	No	Sample with geolocators	Yes, returning individuals
Eggs to Sweden, all delayed	Eggs-1 st yr	40	Laboratory, year	Photoperiodic response	Yes
Eggs from hybrids raised in Sweden	Eggs-1 st yr	40	Laboratory, year	Photoperiodic response	Yes
Swedish eggs to Netherlands	Eggs	200	No	Sample with geolocators	Yes, returning individuals

- Short-distance translocation to sites: 125 pairs, i.e. 250 individuals (2017: 10 control pairs + 40 translocated pairs; 2018: 10 control pairs + 40 translocated pairs, 2019: 25 pairs locally

translocated (no control pairs in 2019, as the part of the project on the dispersal syndromes will stop after 2018)).

- Long-distance translocation between The Netherlands and Sweden:
90 females (2017-19: 30 females/yr)
90 clutches, i.e. ca 540 eggs (2017-19: 30 clutches* 6 eggs=180 eggs/yr)

Life stage: breeding adults and eggs

Total number of individuals (from table, column: # *indiv*):1210 (this includes the 500 eggs transported to Sweden, which are raised their under natural conditions in the wild).

We are aware that these birds fall under legal protection, and that additional permits for holding and transporting them are required. Capturing, transporting and holding individuals, and collecting eggs all are covered for the Netherlands by the Ontheffing Flora and Faunawet from the University of Groningen (FF/75A/2014/057). We request an extension to this permit for transport through Europe. We are in the process of applying for legal permits to import and release them in Sweden with our Swedish counterparts (Prof. J-A. Nilsson, Lund University), as we will be doing for transport to Sweden.

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.

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: to study how animals can cope with fast environmental changes, we need to study them in their natural environment. This knowledge not only provides insight into fundamental evolutionary processes but also can help understanding wild animals fundamental needs and thus implement adequate measures to protect them and their habitats. Therefore, no replacement is possible.

Reduction:

The pilot experiments have shown that the establishment in new areas will be successful, so we kept our sample size relatively small, compared to a situation in which a high proportion of birds leaves the study site. Furthermore, our two translocation experiments share the same control group (control group within The Netherlands) to increase the efficiency of field work and reduce the number of animals disturbed. Using individuals with known pedigree information on timing of arrival and creating variation in this traits reduces sample sizes, especially of the individuals taken into captivity.

Lower sample size will reduce our statistical power and will weaken the impact of our study.

Refinement: All our field experiments are done in such a way to reduce unnatural behaviours to a minimum, as we are interested in the natural behaviour of our birds.

Stress is kept as minimum by transporting the birds individually (and at night for the long distance translocation) and providing them with *ad libitum* food, water and breeding material during the translocation period. Waiting 2-3 days before reopening the aviaries also allows birds to habituate to their novel environment. In addition, translocated birds will not be caught again when nestlings are day 7 old (normal procedure) as ringing and morphological measurements will be done at first capture.

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

We will keep the transport time as short as possible and in individual boxes covered with cloth. We will not mistnet birds by bad weather (too cold / rainy / too hot) to reduce catching stress to birds. Birds in will not be used in the experiment if 1. their mass is < 11 grams upon capture (mean mass is ca. 14g for females and 12g for males) 2. they present any visible injuries or apparent signs of illness.

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.

Pilots of both short and long-distance translocations have previously been performed successfully in our study population. That is why we are confident that our experiments will work and provide publishable results. The reasons why we replicate these experiments are:

1. Pilot experiment of translocation of birds within sites in the Netherlands (2009) did not include any behavioural or diet data (see also appendix 1) of the translocated birds and therefore could not shed light on the role of individual variation in behaviour (personality) in local adaptation processes. We intend to fill this gap.
2. Our pilot experiment of translocation of birds between the Netherlands and Sweden (2010) showed that the technique worked well. However, against our predictions, birds translocated to Sweden bred with a slightly lower success than Swedish birds (they laid earlier but produced smaller clutches) suggesting that long-distance dispersal can be costly. Yet the year of the translocation (2010) happened to be a very cold spring and therefore no benefits were expected of moving north. That is why this experiment needs to be replicated over at least two more years to disentangle experimental effects from ecological effects (such as weather conditions). Furthermore, we have not considered how young raised from these broods would perform, and one of our main objectives of this study is measuring their performance during the rest of their annual cycle.
3. In the past, experiments with flycatchers in the lab have been done showing that they do respond to photoperiod in the timing of their migratory restlessness^{1,2}. However, variation of why some individuals are late and others are early has not been investigated, and here we make the explicit link to genetic and ontogenetic variation, both with and between populations.

1. Gwinner, E. (1996) Circadian and circannual programmes in avian migration. *Journal of Experimental Biology*, **199**, 39-48.
2. Coppack, T., Pulido, F., Czisch, M., Auer, D. P., & Berthold, P. (2003) Photoperiodic response may facilitate adaptation to climate change in long-distance migratory birds. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **270**, S43-S46.

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

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

All adults translocated live in their natural environment.

Part of the juveniles that will be taken into captivity temporarily will be housed in outdoor aviaries, which we think will render the natural development of the birds better, and make that parents can raise their offspring under semi-natural circumstances. Later we move the birds into the animal facility of the Center of Life Sciences of the University of Groningen, which is in accordance with law.

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.

X Yes > Describe this establishment.

The experiment takes place in the wild under the responsibility of the license holder.

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

We will house the individuals in the period after fledging as families in outdoor aviaries of 2x2x2 meter in the forest. Aviaries are checked twice daily on food availability, and animal wellbeing. We stimulate natural food to enter the aviaries by using a light-trap for nocturnal moths, and olfactory attraction for flying insects. This means that both young and adults can perform their normal behaviour and hunt for natural prey items. In addition, we provide high quality insect food.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

X 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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As we place birds in a new environment to which they may not be adapted to, they may perform less well in terms of reproduction or survival. This is exactly what we want to test, and our hypothesis is that under warmer conditions they may actually do better when dispersing to the north. These are wild birds, and therefore they cannot express their natural behaviour while being caged (the captive experiments on young). However, these young individuals have not been living in the wild before we capture them (as nestling) and therefore will get more easily accustomed to lab conditions. These birds are insectivores, which means that high quality food provision is crucial, and extra effort is being paid to this aspect of their welfare.

Explain why these effects may emerge.

See above

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

Partly none for the birds we keep in their under natural environment, and these are the potential effects we are interested in.

For the captive birds we will provide a variety of high quality food in captivity, including live crickets, wax moth larvae, fly and ant pupae, apart from the easily accessible meal worms.

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.

The possibility exists that the birds get injured in the aviary for whatever reason (broken leg, broken wing). In this case we will terminate birds by decapitating them.

Indicate the likely incidence.

In the previous pilots this has not happen, so we consider it unlikely.

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').

For the adults we consider the expected level of discomfort to be mild to moderate. Our aim is to let them reproduce under as natural conditions as possible, and only the period of transport (one day, likely moderate discomfort) and in the aviary (three days, mild discomfort) are likely stressful, whereas furthermore they can behave naturally. For the translocation of the eggs we do not think that this is formally an animal experiment, because chicks just grow up under different but natural conditions. However, it could be that under these conditions growth and survival are worse, but they could also be better. Given the high variation between years in a natural setting, we therefore consider it at most mild discomfort.

For indoor experiments: We consider the expected level of discomfort as moderate because these young cannot express their natural behaviour to migrate to Africa. However, in a natural setting many of these young birds likely die during their first migration from natural causes. As these are originally wild birds, we consider it fair to give them a chance to life in their natural environment after the experiment, and therefore we aim to release the offspring after the experiment (which is possible under the Wet op de Dierproeven). We will do so by first keeping them for a couple of days in the outdoor aviaries in the forest during the breeding season when natural food is abundant. In the cages birds will have the opportunity to practise their hunting skills, and we believe that they will do this quickly as our anecdotal observations show that even offspring that never have been outside are very well able in distinguishing and capturing prey differing in danger (a honeybee vs a bee-mimic hoverfly). We open these aviaries after ca 3-5 days, and keep on providing some additional food for the week thereafter. We consider it likely that birds will possibly survive under these conditions, and monitor their survival (through their ring numbers) to the next years (as part of our normal adult catching monitoring).

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.

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



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. University of Groningen
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------------------|
| 1 | Tracking [REDACTED] with geolocators |

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.

This project aims at investigating the consistency and inheritance in migratory timing and the potential of (ontogenetic) phenotypic plasticity in response to environmental variation. To fulfil this aim we want to track adult [REDACTED] in two subsequent years, and track juveniles from different genetic backgrounds.

Adult tracking: in year t we catch the bird at the end of its nestling period and equip the bird with the lightest available geocator that runs for an entire year (but not heavier than 0.55 g; birds weigh on average 12.5 g). In the spring of year $t+1$ we retrap males with geolocators soon after arrival at the breeding grounds, and females when incubating their eggs (expected return rate is $\sim 40\%$ given our earlier work, which was not lower than the $\sim 45\%$ return rate of unmanipulated males). At the end of the nestling period we repeat the whole sequence again: catching, equipping with geocator and then retrapping the bird during the next year.

We select individuals with pedigree information, so that we can test whether individuals with a genetically early-pedigree signal also migrate earlier than individuals with a late signal. For this relationship with the pedigree we do not necessarily require the repeated measurement.

For the repeated measurements we are interested in how repeatable the different timing traits are among years, and how individual variation among years (i.e. degree of plasticity) can be explained (conditions at the specific wintering place, conditions encountered en route). We realise that sample sizes for the repeated tracks will be relatively low (expected percentage of two successful tracks is $\sim 16\%$), but these will be highly valuable. Note that also single tracks are very valuable, as we link these to the pedigree-information, and still can link them to between individual variation in encountered conditions. Furthermore, we will build up a longer sequence of years with geocator data (data already available now for rather good sample sizes from 2014 and 2016 (returning in 2017). With four more years we can

analyse between year variation in climatic effects on variation in migratory behaviour encompassing the whole annual cycle, which has not yet been done in passerines.

Juvenile tracking: Our interest is how ontogeny and genetic differences determine the timing of migration, both within and between populations. For this reason we carry out experimental translocations (appendix 2), delay hatching and use natural variation in heritable timing variation (from pedigree analysis), and our interest is how this affects their actual migration and wintering habitat choice.

Descriptive work has shown that within our Dutch study population individuals differ consistently in spring arrival, and that this is heritable. Furthermore, we know that Swedish birds start their migration about 10 days later than Dutch birds, and also arrive later at their breeding sites. We want to find out:

1. Whether young from early genotypes as measured from the pedigree from their parents, initiate migration earlier than later genotypes under controlled conditions.
2. Do Dutch birds migrate earlier than Swedish birds because this is genetically determined, or is there also an ontogenetic effect? For this we compare pure Dutch young raised in the Netherlands and raised in Sweden, young from hybrid pairs raised in Sweden, and pure Swedish young raised in Sweden and in the Netherlands (see experiments under appendix 2).

We will be carrying out aviary experiments with birds in these treatments to measure the timing of their migratory restlessness under controlled conditions (see appendix 2), but we are even more interested how these differences develop under the natural environmental conditions.

We will collect a small drop of blood (<10µl) for returning individuals (for DNA), and two feathers (one tertial (newly grown prior to departure at wintering grounds) and one tail feather (grown at previous year's breeding/birth site) for stable isotope research (estimating habitat quality of wintering sites, and potential origin of immigrants).

Parameters in the analyses will be: date of autumn departure, route taken, wintering location (especially longitude, as latitudinal variation is small and more difficult to infer from these dataloggers), date of spring departure, date of spring arrival, migration speed. These all in relation to genotypic variation (from pedigree) and environmental variation (remotely collected, publicly available). Variation in alleles on functional genes related to migration (relating this to tracks). Variation in isotopic ratios of winter grown feathers in relation to wintering latitude and longitude.

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

The geolocators are small chips that record the duration of light and dark period throughout the year each 10 minutes, and records temperatures every four hours. These data allow determining the position of the birds with an accuracy of approximately 200 km. This accuracy is much better than anything else we have from outside the breeding season.

At the moment the lightest geolocator logger for sampling an entire year is 0.55 g, including harness (Intigeo-W50, Migrate Technology Ltd, Cambridge, UK). However, weights still drop progressively and a type of 0.3 g is on the market but still has a battery life just too short for whole annual cycle sampling. The expectation is that within this project we will be able to use lighter loggers than the currently available 0.55 g, and we will use the lightest logger that has a battery life of 11 month.

Attachment of the geolocator logger is done with a leg-loop harness, made of elastic band. This harness does not hamper the bird in flight and the geolocator fits well on the back of the bird, and is mostly covered with feathers, and hence not strongly compromising aerodynamics.

We will capture **adults** when their nestlings are 10-13 d old (fledging occurs around 15 d), in their nest boxes with a spring trap. When the parent is feeding its chicks the trap closes, and the bird is gently taken from the nest. Weight of the parent is taken, and if being heavier than 11 g we will attach a logger. Attaching a geolocator takes not more than five minutes, and earlier measurements in our population showed that [REDACTED] resumed nestling feeding after being fit with a logger.

The challenge for using geolocator loggers on **juveniles** is (1) to increase the local recovery rate as naturally only 8% of offspring returns to the natal site as breeders (because of dispersal), (2) to have full grown fledglings, that have reached their adult dimensions, otherwise the attachment of the loggers during the postfledging period may hamper their flight ability, and hence their survival.

We think we can solve both challenges by keeping the birds into outdoor aviaries in the forest (of at least 2*2*2 m dimensions) for four-five weeks after fledging. This has been done in the past in the closely related collared flycatcher⁴, and this boosted local return rates to 15-20%, likely because this helped the fledglings to survive through their most critical period, and second, that individuals imprinted on the area to return their next year. We will keep families in these aviaries, with their parents from the moment that their chicks are about to fledge (12-13 d age). Previous experience shows that parents quickly resume feeding their offspring when food is provided, and fledglings become independent here from their parents. At this stage we release the parents (i.e. when chicks are about 28 d old), and keep nestlings for two-three more weeks in the aviary. We thus want to release these birds after four-five weeks in captivity, when they have moulted their juvenile plumage into an adult plumage, with geolocators attached.

Recovering and removing the loggers: Each spring we monitor spring arrival of all individuals in our population on a daily basis. When we encounter a male with a geocator, we will capture him between 3-7 d after arrival when soliciting the nest box for arriving females. The logger is taken off the bird through cutting the harness material. At this moment we take a feather sample (for stable isotope research) and a small blood sample for DNA (<10µl). Within 15 minutes after capture the bird is released again. For females, we wait with logger removal until they are incubating, and then they can be easily taken from the nest and procedures are similar as for males.

We have carried out this approach previously for adults and compared return rates and arrival dates of individuals with and without geocator loggers. We did not find any statistical negative effect of the loggers on both traits, although return rates were slightly lower for logger birds¹. We do acknowledge that in years when circumstances during migration are severe, a negative effect of carrying a logger may be present.

Go-no go decisions: For adults: none, since we have clear experience that this can work.

For juveniles: (1) termination of the experiment if for whatever reason survival in the temporary aviaries falls below 90%. (2) if return rates of juveniles with loggers in the first year fall below 5% (often, young birds skip one breeding year, so we can recapture birds in their second year).

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]
4. Löhrl, H. *J. Ornithol.* **100**, 132-140 (1959).

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

We know from our previous work that the timing of autumn and spring migration (both departure and arrival) can be accurately assessed from these loggers, and that for one year we had a very strong correlation between spring departure from Africa and subsequent arrival in Drenthe ($r=0.94!$, $N=14$ returned individuals). This means that the technology works, and sample variance is rather low.

In our sampling scheme we have to include that at least 50% (and likely 60%) of the **adult** individuals disappears between tagging and recapture, mostly due to natural mortality. This is normally higher in females than in males (average local return rate 35% in females and 45% in males; female value likely be deflated through lower site faithfulness).

For juveniles with geocator loggers we cannot make estimates of their return rates in the proposed procedure. Any track of a juvenile will be new to science, since no tracks of small passerines in their first year have been published.

For the genetic effects (i.e. comparison with pedigree-estimates of heritable arrival date, and allelic variation on functional genes) we can use single observations, and by selecting a relatively large fraction in the tails of this distribution, we will regress timing traits measured against the calculated breeding value (~estimate genetic effect). Our expectation is of a clear positive slope, but potentially an interaction with year, as conditions during wintering and/or migration are hypothesized to modulate the

expression of the genetic variation into the phenotype. This may hint to phenotypic plasticity, but when measured between individuals this could also be caused by selective disappearance. Therefore we stress the importance of repeat-tracking of the same individuals in two consecutive years.

B. The animals

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

Species: ■■■■■ (■■■■■ ■■■■■) This is our model for studying the effects of climate change, for which we have a wealth of background information. ■■■■■ ■■■■■ breed readily in nest boxes, and can be ringed and manipulated easily, without clear negative effects. We have built up our study population since 2007, with ~350 pairs annually. Our pedigree is world-class for a wild passerine, with >120 locally born individuals per year recruiting into our breeding population, of which phenotypes of both parents are known. We have been running quantitative genetic models (called animal models) successfully, which showed clear heritable variation in spring arrival timing. Experimental translocations have been successfully done, as have been the geolocator deployment.

Origin: wild individuals.

Life stage: we equip breeding adults from the breeding population and juveniles.

Estimated numbers:

We start each adult cohort with 50 individuals, of which 20 are expected to return after a year. These 20 will once again be deployed with a geolocator, and of these we expect 8 to be recaptured in the subsequent year. We are planning to sample three cohorts, which would involve 150 individuals, of which we will have 60 single tracks, and 24 double tracks.

These sample sizes are based on previous successful work with similar numbers, and with taking the right variation in estimated breeding values (including relatively more individuals from the tails) a positive correlation is hypothesized if variation in migration timing is heritable. We have little idea how strong the environmental components will be, and whether the years are going to be variable enough to pick this up. Previous work on the repeatability of spring arrival in our population did clearly show these annual differences, and therefore we consider it likely to pick these up with this sample size. Sample size here is a balance between the importance of including enough variation (as we are interested in variation!), the low expected level of discomfort, and the high costs of geolocator loggers.

For juveniles we start with 40 individuals in the first year, and decide in the subsequent year based on number of returning individuals whether we continue, and what sample size is needed.

Estimated number of offspring per group for different years:

Experimental treatment	2017	2018	2019
early genotypes, unmanipulated	20	0-30	0-30
late genotypes, unmanipulated	20	0-30	0-30

We start with a modest sample size of 20 individuals per category, and may increase (or decrease/quit) it in the second and third year. Whether we repeat this experiment in the third year depends on the outcomes from the first two years, and the variance observed.

We consider the first year successful if we recover 4 of the 40 geolocator loggers. Although this is a tiny sample size, no first year tracks of any passerine have been published, and therefore even this sample size will be publishable. This is even more so because siblings of these birds will be used for the lab experiments on migratory timing, allowing a comparison between lab-based timing and actual timing in the wild (see appendix 2).

Maximum number of animals used: 310 for using geolocator loggers.

We will be blood sampling each year ca 300 individuals for functional gene screening: 5 years: 1500 individuals.

Our total sample sizes are as follows, including discomfort score.

Experimental group	Stage	# indiv	Captivity & duration	Other experiments	Blood sample	Feather sample	Estim. Discomf.
Geolocation, early genotypes	Juveniles	15-60	Field	None	No	No	1
Geolocation, early genotypes, returned	Juveniles	5-20	Field	None	Yes	Yes	1
Geolocation, late genotypes	Juveniles	15-60	Field	None	No	Yes	1
Geolocation, Late genotypes, returned	Juveniles	5-20	Field	None	Yes	Yes	1
Geolocation, single year (no return)	Adults	90	Field	None	None	Yes	1
Geolocation, multiple years (returned)	Adults	60	Field	None	Yes	Yes	1
Adult blood sample for DNA	Adults	1400	Field	None	Yes	Yes	1
Total number individuals (max)		1710					

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.

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: to study the mechanisms underlying population differentiation in timing and migratory behaviour, we need to study birds in their natural environment. Therefore, no replacement is possible.

Reduction: based on our database, we calculated that we will get about 24 repeat tracks over a period of four years. Reducing this sample size will reduce our statistical power to detect annual variation in how genetic and phenotypic variation is related. By keeping juveniles a short period in captivity, we think we can boost local return rates, and thereby reducing the sample size.

Refinement: stress is kept as minimum by keeping the handling time by experienced field workers as short as possible. We use the smallest possible geolocator loggers. They are being removed as quickly upon return to the breeding grounds as possible.

Having juveniles in captivity will boost their initial survival rate post-fledging, and birds will be better able to carry the logger because they have more experience in flying.

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

We will not equip birds during bad weather (too cold / rainy / too hot) to reduce handling stress to birds. Birds will not be used in the experiment if 1. their mass is < 11 grams upon capture (mean mass is ca. 12.5g for adults feeding offspring, but also varies during and between days) 2. they present any visible

injuries or apparent signs of illness.

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.

There has been no work with geolocators on passerines over extended periods (multiple years) to establish how conditions (e.g. climatic effects) affect migration strategies, and especially not how this affects the translocation of a genotype into a phenotype. Repetition of such a procedure in multiple years is essential to understand the adaptive capacity of populations, as these are always related to environmental conditions. No other research has been performed on how juveniles develop their migratory behaviour, and how much of this is genetic or ontogenetic.

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

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

The animals live in their natural environment. We will keep flycatchers a couple of weeks in outdoor aviaries in the forest (see below).

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.

X Yes > Describe this establishment.

The experiment takes place in the wild under the responsibility of the license holder. Juveniles will be kept in an outdoor aviary for 4-5 weeks just after fledging. This complies with the Flora and Fauna-wet ontheffing of the University of Groningen.

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

We will house the individuals in the period after fledging as families in outdoor aviaries of 2x2x2 meter in the forest. Aviaries are checked twice daily on food availability, and animal wellbeing. We stimulate natural food to enter the aviaries by using a light-trap for nocturnal moths, and olfactory attraction (e.g. rotting fruits) for flying insects. This means that both young and adults can perform their normal behaviour and hunt for natural prey items. In addition, we provide high quality insect food.

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

There is the possibility that individuals carrying a geolocator can fly less long on the same amount of reserves. The reason is that they are slightly heavier, and energetic costs are determined partly by weight. However, we have observed 40-60 hrs non-stop flights over the Sahara desert in our flycatchers with geolocators in the past.

Explain why these effects may emerge.

Bad weather during migration.

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

Taking the lightest possible type.

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.

The possibility exists that the juveniles get injured in the aviary for whatever reason (broken leg, broken wing). In this case we will terminate birds by decapitation.

Indicate the likely incidence.

Not very likely.

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').

Mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

X No

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

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



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.	University of Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Translocation and timing of migration

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.

By manipulating individual dispersal over short (within the Netherlands) and long-distance (between the Netherlands and Sweden) we will gain new knowledge on the importance of dispersal in the process of adaptation to climate change. Translocation is a novel technique that can be applied to a restricted number of taxa including the [REDACTED] for which successful pilot experiments have been previously conducted. Following the behaviour (personality and timing) and the success (in terms of breeding success and survival) of the **adult birds** translocated to new areas will provide important information of which behavioural types (personalities) are better able to colonise new habitats and thus can help populations to adapt to fast environmental changes.

Our interest is how ontogeny and genetic differences determine the timing of migration, both within and between populations, and for this goal our interest is in **young raised in different environments**. For this reason we carry out experimental translocations, delay hatching and use natural variation in heritable timing variation (from pedigree analysis), and take offspring into the lab to measure their migratory restlessness. These birds are nocturnal migrants, and normally sleep at night, but when being in their migratory mood, they start to be active^{1,2}. This activity will be measured using cages where movements can be detected remotely. Our interest is in the timing (and especially the onset) of these movements, with the greatest interest in spring when birds need to migrate at the right moment to their breeding grounds.

Descriptive work has shown that within our Dutch study population individuals differ consistently in spring arrival³, and that this is heritable⁴. Furthermore, we know that Swedish birds start their migration about 10 days later than Dutch birds, and also arrive later at their breeding sites⁵. We want to find out:

1. Whether young from early genotypes as measured from the pedigree from their parents, initiate

- migration earlier than later genotypes under controlled conditions.
2. Whether there is an ontogenetic effect of hatching date: do chicks from eggs delayed for hatching migrate later than siblings not manipulated.
 3. Do Dutch birds migrate earlier than Swedish birds because this is genetically determined, or is there also an ontogenetic effect? For this we compare pure Dutch young raised in the Netherlands and raised in Sweden, young from hybrid pairs raised in Sweden, and pure Swedish young raised in Sweden and in the Netherlands.

The importance of including indoor measurements is that they can be made without any ecological confounding factors. But because we believe that ecology is extremely important in understanding this type of variation we aim to compare the patterns observed in the aviaries with patterns of individuals measured in the wild.

Furthermore, we aim to use the aviary birds for investigating how photoperiods experienced during the annual cycle may constrain the potential for adaptation to climate change. The rationale is that at present all flycatcher populations seem to start migrating to the north after mid-March, which means that they experience stable and mostly increasing photoperiods while migrating northwards. However, if climate change would continue to select for earlier arrival at the breeding grounds, birds may need departing as early as the beginning of March. If they do so, they would initially experience shortening of the photoperiod, as they migrate before the spring equinox, and we want to consider the possibility that this disrupts their migratory behaviour, and thereby sets a limit to adaptation of the annual cycle.

Parameters for translocation:

Establishment success of translocated individuals, in relation to aggressive behaviour.

Behavioural change before and after translocation

Reproductive success among treatments of translocated adults: laying date/ clutch size/ number hatchlings & fledglings/ fledgling condition/ nestling diet

Timing of annual cycle movements of young being raised in different environments (partly through geolocators (see appendix 1) and partly through observing spring arrival dates of untagged birds in the wild).

Parameters in captive birds: onset and duration of autumn migratory restlessness, onset and duration of winter moult, onset of spring migratory restlessness, progress of spring migratory restlessness.

1. Gwinner, E. *Journal of Experimental Biology* **199**, 39-48 (1996).
2. Coppack, T. et al. *Glob. Change Biol.* **14**, 2516-2522 (2008).
3. [REDACTED]
4. [REDACTED]
5. [REDACTED]

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

We plan on doing three types of translocation over three years (2017-2019): (1) short-distance adult (2) translocation long-distance translocation of adult females and (3) eggs:

- **Adult translocation:** To manipulate individual dispersal decisions, we will do short and long-distance translocation experiments (short: between sites within the Netherlands and long: between the Netherlands and Sweden). For that, we will use a protocol that has been developed and successfully conducted in our [REDACTED] population¹:
For the short-distance translocation experiment, established pairs will be caught at their nest box during nest building with a spring trap in the nest box or using mist nets in front of the nest box at our study sites. Both individuals of the same pair are normally captured within half an hour. Then they will be individually transported in small cages (ca. 20x15x18cm) and immediately released into an outdoor aviary (2x2x2m) built around a tree with a nest box in the new site (5 to 10 km away from their original breeding site). Food (mealworms & wax moths larvae), water and nest material will be provided *ad libitum* for 2 to 3 days (pair usually resumes nest building

activity within a day). The aviaries will be covered with double layers of mesh wire (13mm wide), to prevent predators to approach the cage too closely. Birds will be checked and fed daily. After this time period, the netting of the aviary will be opened to release birds without touching them and without removing the nest box. Food will continued being provided at the release site for more than a day to keep the birds attached to the local site. To keep disturbance at a minimum, we will leave the structure of the aviary *in situ* until the next day when it will be removed. A pilot experiment has revealed that >70% of the individuals stays at the new site after the aviary is opened. Control pairs will be exposed to the same procedure with the difference that the aviary will be built around their own nest box, to ensure that they experience the same amount of disturbance. We will also equip a camera in all nests of translocated birds when nestlings are day 9 or 10 old to measure diet brought by parents to their chicks³.

Behavioural scoring before and after short-distance translocation: To measure individual variation in aggressive behaviour (a commonly used personality assay in wild animals), we will conduct "simulated territorial intrusions" by placing a stuffed model of a great tit (*Parus major*), the main nest box competitor of flycatchers, together with playback songs (via a Mp3 player connected to a minispeaker) on the top of the nest box occupied by the focal flycatcher pairs. The devices are left for a maximum period of 15 minutes. If at least one member of the focal pair arrives within this time period and within a radius of 10 meters, an observer sitting quiet at a distance of 10 meters monitors the aggressive behaviour of the focal bird(s) for three minutes. The behaviours monitored include number of alarm calls, minimum approach distance to the stuffed model and number of attacks. The combination of these traits gives a measure of individual aggressive behaviour. Once the time period is over, all the devices are removed.

Each focal pair will be exposed to the stuffed model + playback for a total period of three minutes. To establish whether this individual measure of aggression is repeatable, we will expose each pair up to a total four simulated territorial intrusions (spread across the nest building and incubation periods) with a minimum interval of two days between tests. All tests will be conducted in the morning between 07:00 and 12:00.

For the **long-distance translocation experiment**, the same procedure as above will be followed except that only adult females will be captured and subsequently moved from the Netherlands to Sweden (Lund) by car during the night (550 km away). During the transport, females will be housed individually in small cages covered with cloth and provided with food and water. In Sweden the birds will be released into the same temporary aviaries, build close to a nest box where a wild male is singing. After the female is released in the aviary, we will capture this local male and release him in the aviary, creating hybrid pairs of Dutch females and Swedish males. This procedure has been successfully applied in a previous study, although then we brought complete Dutch pairs to Sweden. Many females during the previous experiment chose a Swedish male, and long-distance dispersal is most likely female biased in nature, and hence this procedure mimics better what happens naturally. It likely will increase the success rate of individuals staying as well, as this was 43% of the females after release in our previous experiment². Most importantly, we are largely interested in how chicks from hybrid pairs perform.

Go-No go decisions: we have ample and positive experience with this experiment, but a clear no-go would be for the translocation to Sweden when females do not pair-up with Swedish males (but again, in our pilot in 2010 this often happened).

- **Egg translocation:** To investigate whether population differentiation in annual timing and wintering grounds is due to genes, ontogeny or both, we will compare the behaviour of five groups of juveniles with different genetic background: (1) genetically Dutch individuals, born in The Netherlands and raised by Dutch parents, (2) genetically Swedish individuals, born in Sweden and raised by Swedish parents, (3) genetically Dutch individuals raised by Swedish parents (issued from translocated eggs to Sweden), (4) hybrids between a Dutch mother and a Swedish father, raised by Dutch females translocated to Sweden, and (5) genetically Swedish individuals raised by Dutch parents (issued from translocated eggs to The Netherlands). To create the experimental group 3, we will translocate Dutch individuals as eggs to Sweden: translocation will be done by collecting freshly laid eggs and store whole clutches cold in plastic

cups lined with cotton for a week before they are moved to Sweden by car. During transport overnight, eggs will be kept in their plastic cups lined with cotton in a cool box. The delay by keeping them cold does not compromise their hatching probability, and will align their hatching date more with the Swedish pairs, needed for incubation and nestling care. The removed eggs come from entire clutches, and we expect pairs to relay after their clutches are taken. Dutch eggs moved to Sweden will replace natural clutches of Swedish parents that care for them and these Swedish eggs are translocated to the Netherlands are raised by Dutch pairs. By doing so, we delay hatching by a week, in order to have a better match with the Swedish phenology, and the expected hatch dates of the nests of the translocated females. We have previously used such procedure to induce hatching delay of clutches in our [REDACTED] population and have shown that this does not affect hatching success significantly (control group=ca. 80% success, n=23, delay group=ca. 74% success, n=23)³.

Go-No go decisions: when hatching of the translocated eggs falls below 50% we first need to find out what the causes of this are, before continuation. Previous experiments in multiple years however has never lead to such low hatching rates.

Migratory restlessness in the lab for young individuals from experiments

We will be using young birds that are (1) either genetically early or late migrants as estimated from their parent's pedigree, (2) delayed hatching (early genotypes only), (3) translocated individuals (see above). Chicks will be raised initially in the field, until they are 13 d old (two days before fledging). When 13 days old we capture the parents and release pairs with their young in outdoor aviaries, where we provide food (mixture of high quality insect food, including fly pupae, wax moth larvae etc). From previous experience we know that parents continue feeding these offspring, until independence. Adults will be released when juveniles are 28 days old, or later if juveniles are still fed by their parents. Juveniles stay in these aviaries in the forest (see appendix 1) for two more weeks (i.e. when chicks are six weeks old). From each brood we then take one male and one female juvenile into the Animal Facility of the Center for Life Science of the University of Groningen, where they will be kept in outdoor cages until mid-July. (The rest of the juveniles is released with a geolocator logger (see appendix 1)). At that moment they will be brought to individual cages indoors at the Animal Facility, under natural photoperiods from either the Netherlands (individuals raised in NL) or southern Sweden (individuals raised in S). Individuals are kept in these individual cages (ca 100x80x80 cm) where we measure their migratory restlessness. This is their nocturnal movement (as measured remotely) which is a good indicator of natural migration in the wild. Twenty days after an individual has started its migratory restlessness (likely a month after being transferred to this cage), we will bring it to a large indoor aviary with photoperiod of the African wintering grounds (10° N). We house the birds here in groups of up to 20 individuals, with ad lib food. From the start of March we transfer individuals again to their individual cages where we measure migratory restlessness, again under African photoperiod. After the initiation of spring migration as measured by migratory restlessness, we will give half of the individuals a reduction in photoperiod, to mimic a photoperiod experienced when migrating well before the spring equinox. We measure the change in migratory restlessness before and after this photoperiod manipulations, as compared to control individuals.

Go-No go decisions: the major potential problem is keeping the birds healthy, which mostly depends on diet. If more than 20% of chicks die in the outdoor aviary, we will decide to release the other individuals with their parents. If more than 25% of individuals die during the period in captivity in the Animal Facility during the entire winter (Aug-April; natural mortality is ca 75% in the same period) we need to seriously consider how to better keep the birds, and may decide to quit this (captivity) part of the project.

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]

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

We have calculated our sample sizes based on the results of our previous pilots (translocation is successful for >70% over short distances and likely about 60% over long distances (when only doing females) and hatching success of removed eggs varies between 70-80%) and such that final sample sizes should be high enough to reveal significant effects of our experiments. In 2017-18 our Dutch samples are relatively bigger because in these years we are interested in the behavioural changes of experimental dispersal, but that project will cease, and therefore the Dutch control numbers drop.

In the aviary experiment are we interested in variation, and whether this variation within and between populations has a genetic and/or ontogenetic background. Therefore we use for our Dutch data individuals with a known pedigree, and consequently we can use correlation between the calculated breeding value (i.e. genetic value for the phenotype) and the onset of migration. The ontogenetic effects of delay can be studied within a family, reducing potential variation. Measurement error/variation of these lab based measurements of migratory restlessness was rather small in a homogeneous sample (SD of start spring migration ~8d, in sample of 7 individuals¹), and therefore we consider it likely that the proposed sample sizes will be reasonable. Sample sizes of the first year and the variance measured will be used for a better estimate in the second year.

1. Coppack, T. *et al. Glob. Change Biol.* **14**, 2516-2522 (2008).

B. The animals

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

Species: We chose the [REDACTED] ([REDACTED]) as a study model because we have knowledge on how this species is affected by environmental changes such as change in prey phenology due to climate change. This knowledge allows us to formulate hypotheses on how flycatchers can adapt to it and design novel experiments. Furthermore, this species is not endangered, readily breed in the nest boxes provided in our study site in Drenthe in high density (about 350 pairs per year), exhibits high level of individual behavioural variation (e.g. in dispersal and aggressiveness) and is relatively easy to monitor through time (thanks to individual rings or tracking). We can thus easily get a high enough sample size to answer research questions.

Origin: the wild. We will use eggs and birds breeding in the nest boxes of our study and eggs from a Swedish population. These two populations are 550km apart.

Estimated numbers:

Experimental group	Stage	# indiv	Captivity & duration	Other experiments	Blood sample	Feather sample	Estim. Discomf.
Translocation short-distance	Ad-pairs	250	Field, 3 d	Behav tests	Yes	yes	1
Translocation long-distance	Ad fem.	100	Field, 3 d	None	Yes	yes	2
Eggs local control	Eggs-1 st yr	40	Lab, year	Photoper resp	Yes	no	2
Eggs local delayed hatching	Eggs-1 st yr	40	Lab, year	Photoper resp	Yes	no	2
Eggs to Sweden, all delayed	Eggs	4-500	No	None	Yes, return	Yes, return	1
Eggs to Sweden, all delayed+Geoloc.	Eggs	0-100	No	None	Yes, return	Yes, return	2
Eggs to Sweden, all delayed	Eggs-1 st yr	40	Lab, year	Photoper resp	Yes	no	2
Eggs from hybrids raised in Sweden	Eggs-1 st yr	40	Lab, year	Photoper resp	Yes	no	2
Swedish eggs to NL	Eggs	150	No	None	Returned	Returned	1
Swedish eggs to NL+Geoloc.	Eggs	50	No	None	Returned	Returned	2
Total number individuals (max)		1210					

Short-distance translocation to sites: 125 pairs, i.e. 250 individuals (2017: 10 control pairs + 40 translocated pairs; 2018: 10 control pairs + 40 translocated pairs, 2019: 25 pairs locally translocated (no control pairs in 2019, as the part of the project on the dispersal syndromes will stop after 2018)).

- Long-distance translocation between The Netherlands and Sweden:
 - 90 females (2017-19: 30 females/yr)
 - 90 clutches, i.e. ca 540 eggs (2017-19: 30 clutches* 6 eggs=180 eggs/yr)

Life stage: breeding adults and eggs

Total number of individuals (from table, column: # *indiv*):1210 (this includes the 500 eggs transported to Sweden, which are raised their under natural conditions in the wild).

We are aware that these birds fall under legal protection, and that additional permits for holding and transporting them are required. Capturing, transporting and holding individuals, and collecting eggs all are covered for the Netherlands by the Ontheffing Flora and Faunawet from the University of Groningen (FF/75A/2014/057). We request an extension to this permit for transport through Europe. We are in the process of applying for legal permits to import and release them in Sweden with our Swedish counterparts (Prof. J-A. Nilsson, Lund University), as we will be doing for transport to Sweden.

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.

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: to study how animals can cope with fast environmental changes, we need to study them in their natural environment. This knowledge not only provides insight into fundamental evolutionary processes but also can help understanding wild animals fundamental needs and thus implement adequate measures to protect them and their habitats. Therefore, no replacement is possible.

Reduction:

The pilot experiments have shown that the establishment in new areas will be successful, so we kept our sample size relatively small, compared to a situation in which a high proportion of birds leaves the study site. Furthermore, our two translocation experiments share the same control group (control group within The Netherlands) to increase the efficiency of field work and reduce the number of animals disturbed. Using individuals with known pedigree information on timing of arrival and creating variation in this traits reduces sample sizes, especially of the individuals taken into captivity.

Lower sample size will reduce our statistical power and will weaken the impact of our study.

Refinement: All our field experiments are done in such a way to reduce unnatural behaviours to a minimum, as we are interested in the natural behaviour of our birds.

Stress is kept as minimum by transporting the birds individually (and at night for the long distance translocation) and providing them with *ad libitum* food, water and breeding material during the translocation period. Waiting 2-3 days before reopening the aviaries also allows birds to habituate to their novel environment. In addition, translocated birds will not be caught again when nestlings are day 7 old (normal procedure) as ringing and morphological measurements will be done at first capture.

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

We will keep the transport time as short as possible and in individual boxes covered with cloth. We will not mistnet birds by bad weather (too cold / rainy / too hot) to reduce catching stress to birds. Birds will not be used in the experiment if 1. their mass is < 11 grams upon capture (mean mass is ca. 14g for females and 12g for males) 2. they present any visible injuries or apparent signs of illness.

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.

Pilots of both short and long-distance translocations have previously been performed successfully in our study population. That is why we are confident that our experiments will work and provide publishable results. The reasons why we replicate these experiments are:

1. Pilot experiment of translocation of birds within sites in the Netherlands (2009) did not include any behavioural or diet data (see also appendix 1) of the translocated birds and therefore could not shed light on the role of individual variation in behaviour (personality) in local adaptation processes. We intend to fill this gap.
 2. Our pilot experiment of translocation of birds between the Netherlands and Sweden (2010) showed that the technique worked well. However, against our predictions, birds translocated to Sweden bred with a slightly lower success than Swedish birds (they laid earlier but produced smaller clutches) suggesting that long-distance dispersal can be costly. Yet the year of the translocation (2010) happened to be a very cold spring and therefore no benefits were expected of moving north. That is why this experiment needs to be replicated over at least two more years to disentangle experimental effects from ecological effects (such as weather conditions). Furthermore, we have not considered how young raised from these broods would perform, and one of our main objectives of this study is measuring their performance during the rest of their annual cycle.
 3. In the past, experiments with flycatchers in the lab have been done showing that they do respond to photoperiod in the timing of their migratory restlessness^{1,2}. However, variation of why some individuals are late and others are early has not been investigated, and here we make the explicit link to genetic and ontogenetic variation, both with and between populations.
1. Gwinner, E. (1996) Circadian and circannual programmes in avian migration. *Journal of Experimental Biology*, **199**, 39-48.
 2. Coppack, T., Pulido, F., Czisch, M., Auer, D. P., & Berthold, P. (2003) Photoperiodic response may facilitate adaptation to climate change in long-distance migratory birds. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **270**, S43-S46.

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

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

All adults translocated live in their natural environment.

Part of the juveniles that will be taken into captivity temporarily will be housed in outdoor aviaries, which we think will render the natural development of the birds better, and make that parents can raise their offspring under semi-natural circumstances. Later we move the birds into the animal facility of the Center of Life Sciences of the University of Groningen, which is in accordance with law.

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.

X Yes > Describe this establishment.

The experiment takes place in the wild under the responsibility of the license holder.

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

We will house the individuals in the period after fledging as families in outdoor aviaries of 2x2x2 meter in the forest. Aviaries are checked twice daily on food availability, and animal wellbeing. We stimulate natural food to enter the aviaries by using a light-trap for nocturnal moths, and olfactory attraction for flying insects. This means that both young and adults can perform their normal behaviour and hunt for natural prey items. In addition, we provide high quality insect food.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

X 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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As we place birds in a new environment to which they may not be adapted to, they may perform less well in terms of reproduction or survival. This is exactly what we want to test, and our hypothesis is that under warmer conditions they may actually do better when dispersing to the north. These are wild birds, and therefore they cannot express their natural behaviour while being caged (the captive experiments on young). However, these young individuals have not been living in the wild before we capture them (as nestling) and therefore will get more easily accustomed to lab conditions. These birds are insectivores, which means that high quality food provision is crucial, and extra effort is being paid to this aspect of their welfare.

Explain why these effects may emerge.

See above

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

Partly none for the birds we keep in their under natural environment, and these are the potential effects we are interested in.

For the captive birds we will provide a variety of high quality food in captivity, including live crickets, wax moth larvae, fly and ant pupae, apart from the easily accessible meal worms.

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.

The possibility exists that the birds get injured in the aviary for whatever reason (broken leg, broken wing). In this case we will terminate birds by decapitating them.

Indicate the likely incidence.

In the previous pilots this has not happen, so we consider it unlikely.

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').

For the adults we consider the expected level of discomfort to be mild to moderate. Our aim is to let them reproduce under as natural conditions as possible, and only the period of transport (one day, likely moderate discomfort) and in the aviary (three days, mild discomfort) are likely stressful, whereas furthermore they can behave naturally. For the translocation of the eggs we do not think that this is formally an animal experiment, because chicks just grow up under different but natural conditions. However, it could be that under these conditions growth and survival are worse, but they could also be better. Given the high variation between years in a natural setting, we therefore consider it at most mild discomfort.

For indoor experiments: We consider the expected level of discomfort as moderate because these young cannot express their natural behaviour to migrate to Africa. However, in a natural setting many of these young birds likely die during their first migration from natural causes. As these are originally wild birds, we consider it fair to give them a chance to life in their natural environment after the experiment, and therefore we aim to release the offspring after the experiment (which is possible under the Wet op de Dierproeven). We will do so by first keeping them for a couple of days in the outdoor aviaries in the forest during the breeding season when natural food is abundant. In the cages birds will have the opportunity to practise their hunting skills, and we believe that they will do this quickly as our anecdotal observations show that even offspring that never have been outside are very well able in distinguishing and capturing prey differing in danger (a honeybee vs a bee-mimic hoverfly). We open these aviaries after ca 3-5 days, and keep on providing some additional food for the week thereafter. We consider it likely that birds will possibly survive under these conditions, and monitor their survival (through their ring numbers) to the next years (as part of our normal adult catching monitoring).

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.

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

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **9017**
2. Titel van het project: **Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places**
3. Titel van de NTS: **Aanpassing van trekvogels aan klimaatsverandering**
4. Type aanvraag:
 - 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: **07-12-2016**
 - aanvraag compleet: **07-12-2016**
 - in vergadering besproken: **15-12-2016**
 - anderszins behandeld: **27-12-2016, 03-01-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **19-12-2016 tot 23-12-2016, 28-12-2016 tot 02-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **23-12-2016, 02-01-2017**
 - advies aan CCD: **13-01-2017**
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.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **19-12-2016, 28-12-2016**

Gestelde vraag/vragen:

Vragen/opmerkingen t.a.v. projectvoorstel

1/ Relevantie is kort en bondig beschreven. De DEC mist hier een verwijzing naar de betekenis van dit onderzoek voor de Evolutionaire biologie: soortvorming, biogeografie, etc.

2/ In 3.4.3 wordt gesteld dat niet nodig is om de translocatie van eieren naar Zweden op te nemen in deze aanvraag maar dat dit wel wordt gedaan voor de samenhang van het onderzoeksprogramma. Daarmee gaan ze dus wel deel uitmaken van de aanvraag en de beoordeling daarvan door de CCD.

Vragen/opmerkingen t.a.v. bijlage 1 – Tracking [REDACTED] with geo-locators

3/ Er zullen 2 veren worden weggenomen bij vogels die vanuit de voorjaarsstrek arriveren op de onderzoeklocaties in Nederland en Zweden: een tertial en een staartpen. Daarbij wordt gesteld dat dit veren zijn die in het overwinteringsgebied zijn gegroeid. Echter, hoe zeker is het dat deze veren inderdaad geruid worden en nieuwe groeien in het wintergebied? Zeker bij adulte vogels is dat niet de regel en vermoedelijk bij 2kj vogels evenmin, zie bijv. Demongin (2016).

Vragen/opmerkingen t.a.v. Bijlage 2: Translocation and timing of migration

4/ Welke go-no go momenten kunnen er worden gehanteerd?

5/ Het totaal aantal benodigde vogels is 710. Het is de DEC niet duidelijk hoe men tot dit aantal komt. Verder heeft de DEC de indruk dat het aantal vogels dat nodig is voor het migration restlessness onderzoek is 'vergeten' Volgens de NTS zijn dit er ca 100.

6/ Bij het short-distance translocatie onderdeel wordt voor 2019 (?) 25 paar genoemd maar geen controle paren; uitleg ontbreekt.

7/ Het ongerief voor de adulte vogels wordt als ten hoogste als 'mild' ingeschat. Het transport naar Zweden is als stressvol getypeerd zonder een niveau van ongerief. In de NTS wordt dit als 'licht' ingeschat. De DEC mist een argumentatie waarom dit ongerief 'mild' is en waarom niet een niveau zwaarder.

8/ Het ongerief voor de juveniele kooivogels is als 'moderate' getypeerd; de NTS geeft dit als 'licht ongerief'. Wat is juist?

9/ Juvenile kooivogels worden na het migration restlessness onderzoek losgelaten; dat is in het daarop volgende broedseizoen. Men zal door monitoring hun overleving volgen. Waarom worden de vogels uitgezet? Wat is de verantwoording hiervoor (t.o.v. termineren), zeker gezien het feit dat de vogels 'ad libitum' zijn opgevoed en vermoedelijk een niet normaal trekgedrag vertonen.

Waarom worden deze vogels dan eventueel niet uitgerust met een geo-locator om hun trekgedrag (route, snelheid, etc.) te monitoren teneinde een idee te krijgen of het experiment al dan niet nadelig is geweest voor hun trekgedrag? Dit lijkt de DEC dan de beste 'nazorg'.

Vervolg vraag

1/ het jaar van onderzoek is gewijzigd in 2019 doch de vraag waarom in dat jaar geen controle paren worden gebruikt is niet beantwoord.

- Datum antwoord: **23-12-2016, 02-01-2017**

- Verstrekt(e) antwoord(en):

- 1/Tekst aangepast: Evolutionary ecology: It has only recently been fully realized that evolutionary and ecological processes can play at similar time scales, and hence that ecological research should not just consider species as static but rather as changing entities. This pleads for a strong integration between evolutionary and ecological studies, and this project fulfills that role. Relatively little proof for evolutionary change in natural populations exist in which the ecological causes of selection are being determined, and again, this study will contribute to this void.
- 2/Dit deel is weggehaald: Although for the current application we do not have to consider the eggs translocated to Sweden, and our experiments there, we consider it important to mention
- 3/ANTWOORD: Er zijn zeer veel ruistrategieën bij verschillende vogelsoorten. Van bonte vliegenvangers is goed bekend dat zowel jongen als ouden hun staartpenen slechts eenmaal per jaar ruien in het broedgebied, en hun tertials (=elleboogveren) tweemaal per jaar (e.g. Jenni & Winkler, Moulting and Ageing of European Passerines, 1994, Academic Press). In enkele gevallen ruien ze hun tertials niet, maar dan is het isotopensignaal gelijk aan het broedgebied, en dat is duidelijk te onderscheiden van een Afrikaans signaal. We verzamelen ook een staartveer omdat die een indicatie kan geven waar immigranten vandaan komen (noordelijker of zuidelijker broedgebieden; zie hiervoor ook Tonra, Both & Marra, 2015: Incorporating site and year-specific deuterium ratios (d2H) from precipitation into geographic assignments of a migratory bird. J Avian Biol). Tekst is aangepast: two feathers (one tertial (newly grown prior to departure at wintering grounds) and one tail feather (grown at previous year's breeding/birth site) for stable isotope research (estimating habitat quality of wintering sites, and potential origin of immigrants).
- 4/ANTWOORD: nu omschreven in deel a: Adult translocation: Go-No go decisions: we have ample and positive experience with this experiment, but a clear no-go would be for the translocation to Sweden when females do

not pair-up with Swedish males (but again, in our pilot in 2010 this often happened). Egg-translocation: Go-No go decisions: when hatching of the translocated eggs falls below 50% we first need to find out what the causes of this are, before continuation. Previous experiments in multiple years however has never lead to such low hatching rates. Migratory restlessness in captive birds: Go-No go decisions: the major potential problem is keeping the birds healthy, which mostly depends on diet. If more than 20% of chicks die in the outdoor aviary, we will decide to release the other individuals with their parents. If more than 25% of individuals die during the period in captivity in the Animal Facility during the entire winter (Aug-April; natural mortality is ca 75% in the same period) we need to seriously consider how to better keep the birds, and may decide to quit this (captivity) part of the project.

- 5/ANTWOORD: In de tabel onder onderdeel B. Animals staan alle aantallen weergegeven, en ook de treatment die vogels krijgen, inclusief de Migratory restlessness (hier aangegeven als Laboratory, year). Het aantal van 710 is verkregen door alle aantallen op te tellen uit de kolom #_Individuals, zonder de 500 eieren die naar Zweden worden gebracht. Gegeven het commentaar van de DEC bij vraag 2 hebben we nu deze wel meegeteld. Tekst veranderd: Total number of individuals (from table, column: # indiv):1210 (this includes the 500 eggs transported to Sweden, which are raised their under natural conditions in the wild).
- 6/ANTWOORD: Er stond per ongeluk twee maal 2018. Veranderd in 2019:2018: 10 control pairs + 40 translocated pairs, 2019: 25 pairs locally translocated)
- 7/ ANTWOORD: we vinden het moeilijk om dit niveau goed in te schatten. Mijn idee is dat het houden van vogels gedurende de reis naar Zweden (ca 10 uur voor vertrek, ca 10 uur rijden) onder de categorie matig valt, maar dit gaat over een kort tijdsbestek. Het houden in een grote kooi in het bos met partner en nestgelegenheid voor drie dagen zou ik als mild categoriseren. Daarom heb ik nu geschreven: mild tot matig. Tekst is aangepast: For the adults we consider the expected level of discomfort to be mild to moderate. Our aim is to let them reproduce under as natural conditions as possible, and only the period of transport (one day, likely moderate discomfort) and in the aviary (three days, mild discomfort) are likely
- 8/ ANTWOORD: aangepast in de NTS naar matig.
- 9/ANTWOORD: Wanneer termineren niet noodzakelijk is, wil ik dat liever niet doen en de vogels de mogelijkheid geven op een normaal leven. Ik ben er redelijk van overtuigd dat deze vogels ook na een jaar in gevangenschap zich buiten weer weten te redden, zeker in het voorjaar, wanneer er veel voedsel aanwezig is. Dit idee komt voort uit mijn anecdotische ervaring dat veel van de eigenschappen in deze vogels aangeboren zijn. Ik heb ooit bonte vliegenvangerjongen zo in gevangenschap gehad, en wanneer ik daar wilde prooien van buiten aan voerde, dan konden de jongen perfect het onderscheid maken tussen een bij (heel voorzichtig vangen en ontleden) en een op een bij-lijkende zweefvlieg (direct vangen en opeten). Jongen zullen de eerste maand in buitenkooien in het bos verblijven, waar ze zeker ook zullen leren om op vliegende insecten te jagen. Ook tijdens het uitwennen zullen de vogels gaan jagen op vliegende prooien, en we zullen nog enkele dagen bijvoeren nadat we de buitenkooien voor het uitwennen hebben open gedaan. Ook is het waarschijnlijk dat de vogels normale trek gaan vertonen, omdat dit een duidelijk aangeboren eigenschap is, en ze ook in het eerste jaar zonder ouders naar Afrika trekken.
- Het is niet zinnig om de vogels met geolocators te monitoren, want die geven alleen de trek van de succesvolle vogels weer (het zijn dataloggers die moeten worden uitgelezen!) en we kunnen beter onderzoeken hoeveel vogels er terugkeren (zoals beschreven) dan de vogels die we uitwennen ook nog eens extra te belasten met een geolocator (ondanks de milde discomfort).
- Tekst is aangepast: As these are originally wild birds, we consider it fair to give them a chance to life in their natural environment after the experiment, and therefore we aim to release the offspring after the experiment (which is possible under the Wet op de Dierproeven). We will do so by first keeping them for a couple of days in the outdoor aviaries in the forest during the breeding season when natural food is abundant. In the cages birds will have the opportunity to practise their hunting skills, and we believe that they will do this quickly as our anecdotal observations show that even offspring that never have been outside are very well able in distinguishing and capturing prey differing in danger (a honeybee vs a bee-mimic hoverfly). We open these aviaries after ca 3-5 days, and keep on providing some additional food for the week thereafter. We consider it likely that birds will possibly survive under these conditions, and monitor their survival (through their ring numbers) to the next years (as part of our normal adult catching monitoring).

Vervolgantwoord

1/ANTWOORD: Er stond per ongeluk twee maal 2018. Veranderd in 2019. Er zijn geen locale controles meer (dat zijn de vogels die helemaal niet worden verplaatst) omdat het project aan de dispersie-syndromen dan afloopt (geen financiering voor de postdoc die daar nu op werkt. Tekst aangepast: 2018: 10 control pairs + 40 translocated pairs, 2019: 25 pairs locally translocated). 2019: 25 pairs locally translocated (no control pairs in 2019, as the part of the project on the dispersal syndromes will stop after 2018))

- **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)? **Ja**
2. 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.
3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
5. 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. Immers, de verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten 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 Flora- en faunawet).

Niet tot de taken van de DEC behorend, overeenkomstig de WoD.

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 begrijpen hoe trekvogels hun jaarlijkse cyclus kunnen aanpassen aan klimaatverandering en wat de beperkingen in deze aanpassingen zijn. Het uiteindelijke doel is om het voortbestaan van de soort te bevorderen, om evolutionaire veranderingen in de context van ecologische veranderingen te begrijpen en het begrijpen van de impact van menselijk handelen op de ecologie teneinde te komen tot meer duurzame beslissingen in deze context.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel onderzoek en onderzoek ter bescherming van de soort. 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 project, wat gericht is op het onderzoek naar hoe trekvogels hun jaarlijkse cyclus kunnen aanpassen aan klimaatverandering en de beperkingen daarin, zijn de vogels zelf en uiteindelijk ook de mens.

Waarden die voor de vogels 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 mens bevorderd kunnen worden: een beter begrip van de ecologie en het gedrag van trekvogels en van de mogelijke aanpassingen en/of beperkingen daarin aan klimaatverandering hetgeen kan leiden tot een verbeterd natuurbeheer en – voor de mens belangrijk – natuurbehoud.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

Niet tot de taken van de DEC behorend overeenkomstig de WoD.

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 alsmede de aandacht voor de drie V's**
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de**

bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC 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*). **N.v.t.**

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

(*) Het betreft hier veldonderzoek

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.**
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van de vogels zal worden aangetast door het aanbrengen van geo/locators en het wegnemen van enkele veren voor isotopenonderzoek.**
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 humane eindpunten in deze aanvraag goed gedefinieerd.

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 voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het betreft onderzoek naar dieren in hun natuurlijke omgeving waarvoor geen alternatieven bestaan

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.

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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 onderhavige projectaanvraag worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd.

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

Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

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

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

NTS

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

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places", dat gericht is op de vraag op welke wijze lange afstandstrekvogels zich aanpassen aan klimaatverandering het lichte-matige ongerief, dat de vogels wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht – matig ongerief** .
Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **naar de indruk van de DEC-RuG zal uitvoering van het onderhavige onderzoek op termijn tot voordeel strekken van de samenleving**

Algemeen: vergroting van de kennis betreffende de invloed van klimaatverandering op de overleving van soorten en hun mogelijkheden tot aanpassing ten behoeve van de bescherming van soorten en effectief, duurzaam gebruik en beheer van de ecosystemen waarin zij voorkomen.

De DEC-RuG is van mening dat de wetenschappelijke belangen zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de vogels waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd in het project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places".
Daarenboven tellen ook de op termijn te behalen voordelen voor de samenleving mee. De betrokken vogels zullen tijdens de experimenten licht tot matig ongerief en enige stress ondervinden. Zij worden door deze experimenten mogelijk in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal niet worden aangetast. Na afloop van de experimenten worden zij vrijgelaten in hun natuurlijke biotoop.
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.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project kunnen leiden tot een zeer relevante uitbreiding van de ecologische kennis over de mechanismen die dieren beschikbaar hebben om zich aan te passen aan veranderende milieumomstandigheden. Een beter begrip van dergelijke mechanismen is van maatschappelijk belang. Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht. Het is zeer aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden.

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: *Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places" - dat gericht is op de vraag op welke wijze lange afstandstrekvogels zich aanpassen aan klimaatverandering - de opoffering en het lichte-matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project* bevestigend.

Hoewel de DEC-RuG het belang van 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 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 hebben in voorgaand onderzoekprogramma's aangetoond te beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. 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 het voorgestelde project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 16 februari 2017 16:51
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag
AVD105002017822
Bijlagen: DEC advies 9017 Both 160217.pdf
Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Het betreft hier een fout. Het stuk ...(of 'aanleiding')... hoorde er niet te staan. De juiste formuleringen voor C2 (en ook C6) staan nu in het aangepaste DEC advies. Het antwoord onder C2 geeft nu antwoord op de vraag.

Hierbij stuur ik u een aangepast DEC advies. Deze is versleuteld met FileSecure

Vriendelijke groeten,

[REDACTED]
Secretaris DEC-RUG

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: maandag 13 februari 2017 14:34
To: [REDACTED]
Subject: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD105002017822

Beste [REDACTED]

Uw antwoord op vraag C2 geeft geen antwoord op de gestelde vragen. Daarnaast is niet duidelijk wat u bedoelt met 'geen aanleiding (of aanleiding)'.
Kunt u aangeven of de Wet Natuurbescherming het project in de weg kan staan? Heeft u dit meegenomen in uw ethische afweging?

Het antwoord ontvangen wij graag uiterlijk vrijdag 17 februari 2017.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 7 februari 2017 13:47

Aan: info@zbo-ccd.nl

Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD105002017822

Beste [REDACTED]

N.a.v. uw vragen (zie onderstaande mail) kan de DEC-RUG u de volgende (aanvullende) antwoorden geven:

Bij vraag C2 : Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel voorstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

Bij vraag C10: De (sociale) huisvesting van de Bonte Vliegenvangers lijkt overeenkomstig de daartoe strekkende verklaring van de aanvrager onder F in de bijlagen afgestemd op de fysiologische en ethologische behoeften van de tijdelijk onder semi-natuurlijke omstandigheden gehouden individuen en analoog aan de vereisten in tabel 8.7 van RICHTLIJN 2010/63/EU.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
Secretaris DEC-RUG

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: woensdag 1 februari 2017 13:18

To: [REDACTED]

Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD105002017822

Geachte DEC-RUG,

Op 13-01-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places' met aanvraagnummer AVD105002017822.

In uw advies geeft u bij C2 aan dat het niet tot uw taak behoort om mogelijk tegenstrijdige wetgeving te signaleren. In het voorzittersoverleg is dit aan de orde geweest. In dit project is andere wetgeving zeer relevant, in ieder geval de Wet Natuurbescherming. Kunt u aangeven of deze wetgeving het project in de weg kan staan? Onder C10 geeft u aan dat u zich ervan verzekerd heeft dat de dieren volgens Bijlage III worden gehuisvest en verzorgd of dat afwijking noodzakelijk is en voldoende onderbouwd. De dieren worden anders dan volgens Bijlage III gehuisvest. Kunt u uw antwoord toelichten waarom u van mening bent dat deze huisvesting noodzakelijk is en of u de onderbouwing voldoende vindt? Het antwoord op deze vragen ontvangen wij graag uiterlijk woensdag 15 februari 2017.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **9017**
2. Titel van het project: **Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places**
3. Titel van de NTS: **Aanpassing van trekvogels aan klimaatsverandering**
4. Type aanvraag:
 - 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: **07-12-2016**
 - aanvraag compleet: **07-12-2016**
 - in vergadering besproken: **15-12-2016**
 - anderszins behandeld: **27-12-2016, 03-01-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **19-12-2016 tot 23-12-2016, 28-12-2016 tot 02-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **23-12-2016, 02-01-2017**
 - advies aan CCD: **13-01-2017, aangepast 16-02-2017**
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.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **19-12-2016, 28-12-2016**

Gestelde vraag/vragen:

Vragen/opmerkingen t.a.v. projectvoorstel

1/ Relevantie is kort en bondig beschreven. De DEC mist hier een verwijzing naar de betekenis van dit onderzoek voor de Evolutionaire biologie: soortvorming, biogeografie, etc.

2/ In 3.4.3 wordt gesteld dat niet nodig is om de translocatie van eieren naar Zweden op te nemen in deze aanvraag maar dat dit wel wordt gedaan voor de samenhang van het onderzoeksprogramma. Daarmee gaan ze dus wel deel uitmaken van de aanvraag en de beoordeling daarvan door de CCD.

Vragen/opmerkingen t.a.v. bijlage 1 – Tracking [REDACTED] with geo-locators

3/ Er zullen 2 veren worden weggenomen bij vogels die vanuit de voorjaarsstrek arriveren op de onderzoeklocaties in Nederland en Zweden: een tertial en een staartpen. Daarbij wordt gesteld dat dit veren zijn die in het overwinteringsgebied zijn gegroeid. Echter, hoe zeker is het dat deze veren inderdaad geruid worden en nieuwe groeien in het wintergebied? Zeker bij adulte vogels is dat niet de regel en vermoedelijk bij 2kj vogels evenmin, zie bijv. Demongin (2016).

Vragen/opmerkingen t.a.v. Bijlage 2: Translocation and timing of migration

4/ Welke go-no go momenten kunnen er worden gehanteerd?

5/ Het totaal aantal benodigde vogels is 710. Het is de DEC niet duidelijk hoe men tot dit aantal komt. Verder heeft de DEC de indruk dat het aantal vogels dat nodig is voor het migration restlessness onderzoek is 'vergeten' Volgens de NTS zijn dit er ca 100.

6/ Bij het short-distance translocatie onderdeel wordt voor 2019 (?) 25 paar genoemd maar geen controle paren; uitleg ontbreekt.

7/ Het ongerief voor de adulte vogels wordt als ten hoogste als 'mild' ingeschat. Het transport naar Zweden is als stressvol getypeerd zonder een niveau van ongerief. In de NTS wordt dit als 'licht' ingeschat. De DEC mist een argumentatie waarom dit ongerief 'mild' is en waarom niet een niveau zwaarder.

8/ Het ongerief voor de juveniele kooivogels is als 'moderate' getypeerd; de NTS geeft dit als 'licht ongerief'. Wat is juist?

9/ Juvenile kooivogels worden na het migration restlessness onderzoek losgelaten; dat is in het daarop volgende broedseizoen. Men zal door monitoring hun overleving volgen. Waarom worden de vogels uitgezet? Wat is de verantwoording hiervoor (t.o.v. termineren), zeker gezien het feit dat de vogels 'ad libitum' zijn opgevoed en vermoedelijk een niet normaal trekgedrag vertonen.

Waarom worden deze vogels dan eventueel niet uitgerust met een geo-locator om hun trekgedrag (route, snelheid, etc.) te monitoren teneinde een idee te krijgen of het experiment al dan niet nadelig is geweest voor hun trekgedrag? Dit lijkt de DEC dan de beste 'nazorg'.

Vervolg vraag

1/ het jaar van onderzoek is gewijzigd in 2019 doch de vraag waarom in dat jaar geen controle paren worden gebruikt is niet beantwoord.

- Datum antwoord: **23-12-2016, 02-01-2017**

- Verstrekt(e) antwoord(en):

- 1/Tekst aangepast: Evolutionary ecology: It has only recently been fully realized that evolutionary and ecological processes can play at similar time scales, and hence that ecological research should not just consider species as static but rather as changing entities. This pleads for a strong integration between evolutionary and ecological studies, and this project fulfills that role. Relatively little proof for evolutionary change in natural populations exist in which the ecological causes of selection are being determined, and again, this study will contribute to this void.
- 2/Dit deel is weggehaald: Although for the current application we do not have to consider the eggs translocated to Sweden, and our experiments there, we consider it important to mention
- 3/ANTWOORD: Er zijn zeer veel ruistrategieën bij verschillende vogelsoorten. Van bonte vliegenvangers is goed bekend dat zowel jongen als ouden hun staartpenen slechts eenmaal per jaar ruien in het broedgebied, en hun tertials (=elleboogveren) tweemaal per jaar (e.g. Jenni & Winkler, Moulting and Ageing of European Passerines, 1994, Academic Press). In enkele gevallen ruien ze hun tertials niet, maar dan is het isotopensignaal gelijk aan het broedgebied, en dat is duidelijk te onderscheiden van een Afrikaans signaal. We verzamelen ook een staartveer omdat die een indicatie kan geven waar immigranten vandaan komen (noordelijker of zuidelijker broedgebieden; zie hiervoor ook Tonra, Both & Marra, 2015: Incorporating site and year-specific deuterium ratios (d2H) from precipitation into geographic assignments of a migratory bird. J Avian Biol). Tekst is aangepast: two feathers (one tertial (newly grown prior to departure at wintering grounds) and one tail feather (grown at previous year's breeding/birth site) for stable isotope research (estimating habitat quality of wintering sites, and potential origin of immigrants).
- 4/ANTWOORD: nu omschreven in deel a: Adult translocation: Go-No go decisions: we have ample and positive experience with this experiment, but a clear no-go would be for the translocation to Sweden when females do

not pair-up with Swedish males (but again, in our pilot in 2010 this often happened). Egg-translocation: Go-No go decisions: when hatching of the translocated eggs falls below 50% we first need to find out what the causes of this are, before continuation. Previous experiments in multiple years however has never lead to such low hatching rates. Migratory restlessness in captive birds: Go-No go decisions: the major potential problem is keeping the birds healthy, which mostly depends on diet. If more than 20% of chicks die in the outdoor aviary, we will decide to release the other individuals with their parents. If more than 25% of individuals die during the period in captivity in the Animal Facility during the entire winter (Aug-April; natural mortality is ca 75% in the same period) we need to seriously consider how to better keep the birds, and may decide to quit this (captivity) part of the project.

- 5/ANTWOORD: In de tabel onder onderdeel B. Animals staan alle aantallen weergegeven, en ook de treatment die vogels krijgen, inclusief de Migratory restlessness (hier aangegeven als Laboratory, year). Het aantal van 710 is verkregen door alle aantallen op te tellen uit de kolom #_Individuals, zonder de 500 eieren die naar Zweden worden gebracht. Gegeven het commentaar van de DEC bij vraag 2 hebben we nu deze wel meegeteld. Tekst veranderd: Total number of individuals (from table, column: # indiv):1210 (this includes the 500 eggs transported to Sweden, which are raised their under natural conditions in the wild).
- 6/ANTWOORD: Er stond per ongeluk twee maal 2018. Veranderd in 2019:2018: 10 control pairs + 40 translocated pairs, 2019: 25 pairs locally translocated)
- 7/ ANTWOORD: we vinden het moeilijk om dit niveau goed in te schatten. Mijn idee is dat het houden van vogels gedurende de reis naar Zweden (ca 10 uur voor vertrek, ca 10 uur rijden) onder de categorie matig valt, maar dit gaat over een kort tijdsbestek. Het houden in een grote kooi in het bos met partner en nestgelegenheid voor drie dagen zou ik als mild categoriseren. Daarom heb ik nu geschreven: mild tot matig. Tekst is aangepast: For the adults we consider the expected level of discomfort to be mild to moderate. Our aim is to let them reproduce under as natural conditions as possible, and only the period of transport (one day, likely moderate discomfort) and in the aviary (three days, mild discomfort) are likely
- 8/ ANTWOORD: aangepast in de NTS naar matig.
- 9/ANTWOORD: Wanneer termineren niet noodzakelijk is, wil ik dat liever niet doen en de vogels de mogelijkheid geven op een normaal leven. Ik ben er redelijk van overtuigd dat deze vogels ook na een jaar in gevangenschap zich buiten weer weten te redden, zeker in het voorjaar, wanneer er veel voedsel aanwezig is. Dit idee komt voort uit mijn anecdotische ervaring dat veel van de eigenschappen in deze vogels aangeboren zijn. Ik heb ooit bonte vliegenvangerjongen zo in gevangenschap gehad, en wanneer ik daar wilde prooien van buiten aan voerde, dan konden de jongen perfect het onderscheid maken tussen een bij (heel voorzichtig vangen en ontleden) en een op een bij-lijkende zweefvlieg (direct vangen en opeten). Jongen zullen de eerste maand in buitenkooien in het bos verblijven, waar ze zeker ook zullen leren om op vliegende insecten te jagen. Ook tijdens het uitwinnen zullen de vogels gaan jagen op vliegende prooien, en we zullen nog enkele dagen bijvoeren nadat we de buitenkooien voor het uitwinnen hebben open gedaan. Ook is het waarschijnlijk dat de vogels normale trek gaan vertonen, omdat dit een duidelijk aangeboren eigenschap is, en ze ook in het eerste jaar zonder ouders naar Afrika trekken.
- Het is niet zinnig om de vogels met geolocators te monitoren, want die geven alleen de trek van de succesvolle vogels weer (het zijn dataloggers die moeten worden uitgelezen!) en we kunnen beter onderzoeken hoeveel vogels er terugkeren (zoals beschreven) dan de vogels die we uitwinnen ook nog eens extra te belasten met een geolocator (ondanks de milde discomfort).
- Tekst is aangepast: As these are originally wild birds, we consider it fair to give them a chance to life in their natural environment after the experiment, and therefore we aim to release the offspring after the experiment (which is possible under the Wet op de Dierproeven). We will do so by first keeping them for a couple of days in the outdoor aviaries in the forest during the breeding season when natural food is abundant. In the cages birds will have the opportunity to practise their hunting skills, and we believe that they will do this quickly as our anecdotal observations show that even offspring that never have been outside are very well able in distinguishing and capturing prey differing in danger (a honeybee vs a bee-mimic hoverfly). We open these aviaries after ca 3-5 days, and keep on providing some additional food for the week thereafter. We consider it likely that birds will possibly survive under these conditions, and monitor their survival (through their ring numbers) to the next years (as part of our normal adult catching monitoring).

Vervolgantwoord

1/ANTWOORD: Er stond per ongeluk twee maal 2018. Veranderd in 2019. Er zijn geen locale controles meer (dat zijn de vogels die helemaal niet worden verplaatst) omdat het project aan de dispersie-syndromen dan afloopt (geen financiering voor de postdoc die daar nu op werkt. Tekst aangepast: 2018: 10 control pairs + 40 translocated pairs, 2019: 25 pairs locally translocated). 2019: 25 pairs locally translocated (no control pairs in 2019, as the part of the project on the dispersal syndromes will stop after 2018))

- **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)? **Ja**
2. 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.
3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
5. 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. Immers, de verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten 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 Flora- en faunawet).

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 vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

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 begrijpen hoe trekvogels hun jaarlijkse cyclus kunnen aanpassen aan klimaatverandering en wat de beperkingen in deze aanpassingen zijn. Het uiteindelijke doel is om het voortbestaan van de soort te bevorderen, om evolutionaire veranderingen in de context van ecologische veranderingen te begrijpen en het begrijpen van de impact van menselijk handelen op de ecologie teneinde te komen tot meer duurzame beslissingen in deze context.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel onderzoek en onderzoek ter bescherming van de soort. 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 project, wat gericht is op het onderzoek naar hoe trekvogels hun jaarlijkse cyclus kunnen aanpassen aan klimaatverandering en de beperkingen daarin, zijn de vogels zelf en uiteindelijk ook de mens.

Waarden die voor de vogels 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 mens bevorderd kunnen worden: een beter begrip van de ecologie en het gedrag van trekvogels en van de mogelijke aanpassingen en/of beperkingen daarin aan klimaatverandering hetgeen kan leiden tot een verbeterd natuurbeheer en – voor de mens belangrijk – natuurbehoud.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

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 vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

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 alsmede de aandacht voor de drie V's

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC 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*). **N.v.t.**

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

(*) Het betreft hier veldonderzoek

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is. De (sociale) huisvesting van de Bonte Vliegenvangers lijkt overeenkomstig de daartoe strekkende verklaring van de aanvrager onder F in de bijlagen afgestemd op de fysiologische en ethologische behoeften van de tijdelijk onder semi-natuurlijke omstandigheden gehouden individuen en analoog aan de vereisten in tabel 8.7 van RICHTLIJN 2010/63/EU.**
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).

De integriteit van de vogels zal worden aangetast door het aanbrengen van geo/locators en het wegnemen van enkele veren voor isotopenonderzoek.

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 humane eindpunten in deze aanvraag goed gedefinieerd.

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 voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het betreft onderzoek naar dieren in hun natuurlijke omgeving waarvoor geen alternatieven bestaan

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.

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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 onderhavige projectaanvraag worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd.

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.

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

NTS

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

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places", dat gericht is op de vraag op welke wijze lange afstandstrekvogels zich aanpassen aan klimaatverandering het lichte-matige ongerief, dat de vogels wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht – matig ongerief** .

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **naar de indruk van de DEC-RuG zal uitvoering van het onderhavige onderzoek op termijn tot voordeel strekken van de samenleving**

Algemeen: vergroting van de kennis betreffende de invloed van klimaatverandering op de overleving van soorten en hun mogelijkheden tot aanpassing ten behoeve van de bescherming van soorten en effectief, duurzaam gebruik en beheer van de ecosystemen waarin zij voorkomen.

De DEC-RuG is van mening dat de wetenschappelijke belangen zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de vogels waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd in het project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places".

Daarenboven tellen ook de op termijn te behalen voordelen voor de samenleving mee. De betrokken vogels zullen tijdens de experimenten licht tot matig ongerief en enige stress ondervinden. Zij worden door deze experimenten mogelijk in hun welzijn

geschaad. De integriteit van de dieren zal niet worden aangetast. Na afloop van de experimenten worden zij vrijgelaten in hun natuurlijke biotoop.

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.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project kunnen leiden tot een zeer relevante uitbreiding van de ecologische kennis over de mechanismen die dieren beschikbaar hebben om zich aan te passen aan veranderende milieumomstandigheden.

Een beter begrip van dergelijke mechanismen is van maatschappelijk belang.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht.

Het is zeer aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden.

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: *Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places" - dat gericht is op de vraag op welke wijze lange afstandstrekvogels zich aanpassen aan klimaatverandering - de opoffering en het lichte-matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project* bevestigend.

Hoewel de DEC-RuG het belang van 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 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 hebben in voorgaand onderzoekprogramma's aangetoond te beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. 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 het voorgestelde project "Adaptation to climate change: local evolution vs. dispersal to better places" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

14 juli 2016

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

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

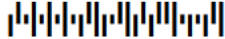


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD105002017822

Bijlagen

2

Datum 16 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 januari 2017. Het gaat om uw project "Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002017822. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

16 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017822

Datum:
16 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017822

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 4 januari 2017
Geplande einddatum: 31 maart 2022
Titel project: Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places
Titel niet-technische samenvatting: Aanpassing van trekvogels aan klimaatsverandering
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED], 9713 AV Groningen
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
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

[REDACTED]
A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN
[POSTNET]

**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
AVD105002017822
Bijlagen
2

Datum 16 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 januari 2017
Vervaldatum: 15 februari 2017
Factuurnummer: 170822

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002017822	€ 1.287,00

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

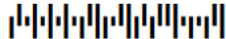


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD105002017822

Datum 1 februari 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 13 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places" met aanvraagnummer AVD105002017822. 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

In de NTS geeft u onder 3.3 aan 'ca 2000 individuen' te gebruiken. Kunt u hier het exacte aantal opschrijven? Dit aantal moet overeen komen met de aantallen genoemd in de Bijlagen Dierproeven.

Onder 3.5 in de NTS geeft u het te verwachten ongerief aan per handeling. Sommige dieren ondergaan meerdere van deze handelingen. Kunt u in percentages aangeven voor hoeveel dieren welk ongerief verwacht wordt?

Wij ontvangen graag een nieuwe NTS waarin bovenstaande punten zijn aangepast.

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 aangeven hoeveel dieren u in totaal wilt aanvragen? Kunt u hierbij aangeven hoe u tot dit totaal komt? Het is bijvoorbeeld niet duidelijk of de 1500 dieren waarbij bloed wordt afgenomen

(deels) dezelfde dieren zijn als de 310 dieren met een geolocator.

Voor Bijlage 3.4.4.2 gelden verschillende ongeriefsclassificaties. Kunt u aangeven voor hoeveel dieren welk ongerief verwacht wordt?

Wij ontvangen graag nieuwe Bijlagen Dierproeven waarin bovenstaande punten zijn aangepast.

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Datum:

1 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017822



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: AVD105002017822

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:

1 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017822

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

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 14 februari 2017 12:24
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvulling AVD105002017822

Beste [REDACTED]
Dank voor uw toelichting, dat is helder zo; het is niet nodig nieuwe Bijlages te sturen.

Wilt u nog wel een nieuwe NTS sturen waar het ongerief voor alle dieren genoemd is?

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 13 februari 2017 21:39
Aan: Info-zbo
Onderwerp: Re: Aanvulling AVD105002017822

Beste [REDACTED]

Mijn excuses voor de onduidelijkheid. Ik was even bang dat ik niet meer goed kon optellen, maar in de gegeven aantallen zit wel logica, maar die heb ik niet expliciet gemaakt. In bijlage 2 staan 0-100 jongen uit getransloceerde eieren die mogelijk een geolocator krijgen en 400-500 eieren die er geen krijgen. Hoewel dit niet genoemd wordt, zijn dit er samen 500, en beslissen we op basis een pilot met geloggerde jongen in het eerste jaar of we ook een deel van de getransloceerde jongen gaan loggen. Het totaal dat hier staat is dus wel correct.

Voor bijlage 1 is dat net zo. In de tekst staat dat we max 1500 individuen willen bloedmonsters, en in de tabel staan er 1400. Maar we zullen ook monsters nemen van zeker 100 individuen die terugkeren met een geolocator logger, en dan komt dit wel weer samen op 1500 individuen uit. De totaalaantallen kloppen volgens mij dus wel. Moet ik dit nog explicieter uitleggen in de voorstellen, of is deze toelichting ook voldoende?

Bedankt en vriendelijke groet

[REDACTED]
2017-02-13 13:32 GMT+01:00 Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>:

Geachte [REDACTED]

Dank voor uw antwoorden. De aantallen in Bijlage 1 en de uitsplitsing naar ongerief in Bijlage 2 zijn nu zeer helder weergegeven.

Over de leges: ik heb dit nagevraagd bij de verantwoordelijke personen hier aan de universiteit, en zij vertellen mij dat dit bedrag reeds is voldaan.

Met vriendelijke groet

██████████

Op 1-2-2017 14:03, Info-zbo wrote:

Geachte meneer, mevrouw,

Op 13 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places" met aanvraagnummer AVD105002017822. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. 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 er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

██████████

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl



> 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
AVD105002017822
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 13 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places" met aanvraagnummer AVD105002017822. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 3, 13 en 14 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het exact aantal dieren en een procentuele weergave van het ongerief in de NTS. Daarnaast ging het om het aantal dieren in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en de ongeriefsclassificaties voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.2.

Beslissing

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

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 februari 2017 tot en met 31 maart 2022.

Het gebruik van wilde dieren is in uw aanvraag voldoende beargumenteerd. U bent zelf verantwoordelijk voor het voldoen aan andere wetgeving en voor het voldoen aan wetgeving in andere landen.

Deze vergunning geldt alleen voor experimenten die worden uitgevoerd in Nederland. Voor de uitvoer van dit project is ook een vergunning op basis van Wet Natuurbescherming nodig.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 16 februari 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC is gevraagd aan te geven of andere wetgeving het project in de weg kan staan en of ze heeft meegenomen in haar afweging dat de huisvesting niet volgens Bijlage III is.

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.

Bezwaar

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

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

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

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


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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017822



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 20 februari 2017 tot en met 31 maart 2022, voor het project "Adaptation to climate change: local evolution vs dispersal to better places" met aanvraagnummer AVD105002017822, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 januari 2017, ontvangen op 13 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 3, 13 en 14 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Tracking [REDACTED] with geolocators				
	Andere vogels (andere Aves) / Bonte vliegenvanger	1.810	Licht	
3.4.4.2 Translocation and timing of migration				
	Andere vogels (andere Aves) / Bonte vliegenvanger	1.210	42% Matig 58% Licht	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD105002017822

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

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



Aanvraagnummer:

AVD105002017822

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:

AVD105002017822

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.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017823	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Project proposal				x		x	x		
4	bijlage animal procedure 1			x						
5	bijlage animal procedure 2				x		x	x		
6	bijlage animal procedure 3				x		x	x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x			
8	DEC advies				x		x			
9	Advies CCD aan bestuur		X							x
10	Beschikking				x		x			



18 JAN. 2017

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 <input type="checkbox"/> 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	01179037
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	NL45ABNA0474567206
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | Ant. Deusinglaan 1 [REDACTED] 9713 AV Groningen |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-


6 Ondertekening

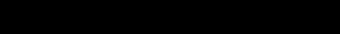
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

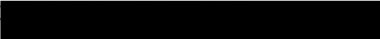
Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

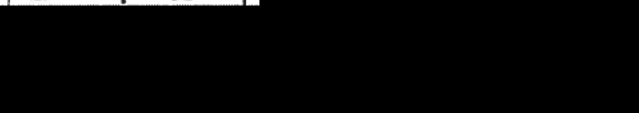

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 16-01-2017 

Handtekening 




Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

De grutto is een van onze meest karakteristieke weidevogels. Mannetjes en vrouwtjes lijken sterk op elkaar en zijn zonder DNA-analyse niet met zekerheid te onderscheiden. In het voorjaar leggen ze hun 4 eieren in onze open polderlandschappen. Na bijna 4 weken komen de eieren uit, verlaten de kuikens meteen het nest en moeten de kuikens vanaf de eerste dag zelf hun eten zoeken. De ouders begeleiden de kuikens nog eens minimaal 4 weken voordat ze kunnen vliegen. Na het broedseizoen trekken ze naar hun overwinteringsgebieden in West Afrika en op het Iberisch schiereiland. Nederland is voor de Grutto het belangrijkste broedgebied in West Europa en lange tijd boden onze polders plek aan 80 tot 90% van de Noordwest Europese populatie. Ondanks alle inspanningen in de afgelopen 30 jaar om de Nederlandse weidevogels te beschermen, gaat het bijzonder slecht met vogels van het agrarische gebied, inclusief de grutto. De belangrijkste oorzaken hiervan zijn intensivering van de landbouw, toegenomen predatie en verstedelijking^{1,2,3,4}, waardoor er niet genoeg jonge dieren overleven om de jaarlijkse sterfte van volwassen dieren te compenseren.

Om een onderbouwde strategie te ontwikkelen voor de bescherming van een soort is een zeer goede analyse van de populatiedynamica van groot belang. Er zal gezocht moeten worden welke sleutelfactoren de dynamiek van een soort bepalen wanneer het gehele areaal en de levenscyclus (nestoverleving, kuikenmortaliteit, mortaliteit in het eerste jaar, mortaliteit tijdens trek en overwintering, mortaliteit adulte dieren tijdens broedseizoen) in beschouwing wordt genomen. Een dergelijke veelomvattende vraag vereist zeer gedegen populatieonderzoek over een langere periode op een grote ruimtelijke schaal. Al in 2004 is onze onderzoeksgroep een langjarig demografisch onderzoek gestart, aanvankelijk aan een gruttipopulatie op de Workumerwaard bij Workum in Zuidwest Friesland, waar onder meer deze aspecten worden onderzocht. In de periode 2007-2016 is het onderzoek echter uitgebreid, met speciale aandacht voor de effecten van versnippering van de grutto-broedpopulatie, met financiering van o.a. het (ex-)ministerie van LNV, de Provincie Fryslân, het Prins Bernard Cultuurfonds, Vogelbescherming Nederland en niet in de laatste plaats de ██████████ van onderzoeksleider ██████████. Het oorspronkelijke onderzoeksgebied is daartoe opgeschaald naar een groot deel van Zuidwest Fryslân⁵. Het is een van de beste gruttogebieden in Nederland maar net als overal in ons land zijn ook hier op veel plaatsen grutto's (vrijwel) verdwenen zodat het onderzoeksgebied nu een representatief voorbeeld is van de situatie in de rest van ons land. Er zijn echter nog steeds plekken met hoge dichtheden grutto's maar we moeten ons afvragen of in het huidige landschap deze beste gebieden nog steeds goed genoeg zijn om een stabiele populatie in Nederland te garanderen.

Uit eerder onderzoek is gebleken⁶ dat de crux voor het slagen van het weidevogelbeleid zit in een voldoende hoge overleving van de kuikens; de overleving van volwassen vogels is al meer dan 30 jaar constant en niet zorgwekkend⁴. Het lijkt nu duidelijk waarom de populatie afneemt: de (overigens maar kleine) overproductie van kuikens in goede weidevogelkernen vloeit weg naar gebieden (met veelal intensieve landbouw) waar de sterfte van volwassen vogels niet wordt gecompenseerd door voldoende rekrutering van juveniele vogels⁷. Alleen door het inrichten van gebieden met uitgekiend weidevogelbeheer van voldoende omvang kan zulk 'weglekken' worden voorkomen. Het staat vast dat kuikens het beter doen op kruidenrijk grasland: op monocultures van hoogproductieve grassen blijft de groei achter en zullen kuikens eerder sterven, direct door voedselgebrek, of indirect door toegenomen predatiekansen omdat ze moeten blijven bewegen ook als er alarm is⁸. Er zijn simpelweg te weinig kuikens die volwassen worden, waardoor de populatie gemiddeld zo'n 5% per jaar krimpt.

Om het tij te keren zet de Nederlandse overheid in op het concentreren van beleid en middelen in zogeheten kerngebieden, gebieden met bovengemiddelde dichtheden weidevogels en het perspectief dat de vogels zich daar op langere termijn kunnen handhaven. In deze gebieden wordt geprobeerd om in samenwerking met boeren, terreinbeheerders, waterschappen, jagers en burgers passende maatregelen te nemen om de weidevogels meer kans op succesvolle reproductie te geven. Dat betekent in de praktijk meestal dat boeren op vrijwillige basis beheersovereenkomsten kunnen afsluiten. Ze krijgen dan een vergoeding voor bijvoorbeeld het sparen van nesten, uitstellen van maaien, vernatten van hun percelen of minder zwaar bemesten. De effectiviteit van dit zogeheten agrarisch natuurbeheer staat al jarenlang ter discussie⁹ en er bestaat daarom grote behoefte aan onafhankelijke toetsing van dit beleid en wetenschappelijke onderbouwing van de voorgestelde beheersmaatregelen. De monitoring van de

gruttopopulatie in Zuidwest Friesland voorziet in deze behoefte.

We weten dus dat de overleving van kuikens de sleutel is voor een herstel van de populatie. Maar we weten nog betrekkelijk weinig van de ecologische randvoorwaarden die kuikens stellen aan hun biotoop. Zo is het onvoldoende duidelijk welk graslandbeheer leidt tot een optimaal voedselaanbod tijdens de verschillende leeftijdsfasen voor het uitvliegen en welk habitat door kuikens gebruikt wordt in de fase daarna. Van de trekstrategie van jonge grutto's is nog weinig bekend en het is daardoor onduidelijk of er in de periode voorafgaand aan hun eerste zuidwaartse migratie of tijdens hun eerste verblijf buiten Nederland bottlenecks zijn die de overlevingskansen en daarmee de kans op herstel van de populatie nog verder doen afnemen. We weten weinig over welke overwinteringsgebieden ze gebruiken en welke gebieden ze aandoen tijdens de trek daar naar toe. Er zijn sterke aanwijzingen dat een steeds groter deel van de populatie niet meer in Afrika maar in Iberia overwintert wat wellicht een effect heeft op de overlevingskansen gedurende de winter¹⁰. Jonge dieren zijn exploratiever dan volwassenen en we verwachten dat het juist jonge vogels zijn die ontdekken dat het niet meer nodig is om twee keer per jaar de Sahara over te steken. De keuze voor een overwinteringsgebied wordt waarschijnlijk al vroeg in het leven gemaakt: uit kleurringonderzoek blijkt dat volwassen vogels behoorlijk trouw zijn aan een overwinteringsgebied. Maar als overwinteren in Europa voordeliger is, waarom gaat deze verschuiving niet sneller?

Om deze vragen te kunnen beantwoorden moeten we begrijpen welke factoren van invloed zijn op het trekgedrag (zoals de timing en snelheid van trek, vliegroute en keuze van stopover- en overwinteringsgebieden) van (jonge) grutto's. Daarbij kan onderscheid gemaakt worden tussen genetische en omgevingsfactoren. We hebben tot nu toe geen aanwijzingen dat overwinteringsplek genetisch bepaald wordt, noch dat jonge grutto's met hun ouders meevliegen naar hun overwinteringsgebied: in veel gevallen overwinteren vader en/of moeder waarschijnlijk op een andere plek dan hun jong(en). Een alternatieve verklaring voor het feit dat jonge grutto's toch 'traditionele' doch mogelijk suboptimale overwinteringskeuzes blijven maken is dat ze andere adulte – ervaren en succesvolle – vogels volgen tijdens de trek.

Naast sociale overerving hebben omstandigheden in het vroege leven van een grutto mogelijk een effect op het latere trekgedrag van grutto's. Wellicht blijken laat uitgevlogen jongen en jongen in slechte conditie net als bij Lepelaars een grotere kans te hebben om in Europa te gaan overwinteren¹¹. We hebben al laten zien dat de conditie van jonge grutto's sterk afhangt van de kwaliteit van het opgroeihabitat. Daarmee zou het beheer van de Nederlandse graslanden een onverwacht effect hebben op de keuzes die jonge grutto's later in hun leven maken.

Daarnaast kan ook het geslacht een rol spelen: vrouwen zijn bij grutto's groter dan mannen. Verschillen in voedsel- en energiebehoefte kunnen daarom al in een vroeg stadium leiden tot gedifferentieerde overleving van mannelijke en vrouwelijke kuikens. Geslachtsafhankelijk gebiedsgebruik op latere leeftijd in zowel broed- als overwinteringsgebieden (en wellicht ook tijdens de trek) wordt wellicht mede daardoor veroorzaakt, maar ook competitie zou een rol kunnen spelen. Een vergelijking van voedselopnamesnelheden en tijdsbudgetten van mannen en vrouwen in verschillende stopover- en overwinteringsgebieden zal hier meer inzicht over geven. Voedselopnamesnelheden en tijdsbesteding geven ook een indicatie over de voedselkwaliteit van een bepaald gebied, wat mogelijk ook een rol speelt in de keuze van jonge grutto's om op een bepaalde plek zich voor te bereiden op de trek, tijdens de trek te stoppen of te blijven om de winter door te brengen.

Het demografisch onderzoek is vooral bedoeld om de vinger aan de pols van de grutto-populatie te houden. Het heeft een beschrijvend karakter en is opgezet om de globale veranderingen in de belangrijkste populatie-parameters te detecteren maar niet om ze te verklaren. Om te begrijpen waardoor die veranderingen veroorzaakt worden en hoe je ze bij kunt sturen, zal je moeten inzoomen op de achterliggende processen en soms gebruik moeten maken van experimenten. Vandaar dat we in dit onderzoek in het bijzonder focussen op voedsel, habitat en trekgedrag van kuikens want daarin zit de belangrijkste bottleneck voor het herstel van de gruttopopulatie in Nederland.

- ¹ Kruk M., Noordervliet M. A. W. & ter Keurs W. J. 1997. Survival of black-tailed godwit chicks *Limosa limosa* in intensively exploited grassland areas in The Netherlands. *Biological Conservation*, 80: 127-133.
- ² Teunissen W., Schekkerman H., Willems F. & Majoor F. 2008. Identifying predators of eggs and chicks of lapwing *Vanellus vanellus* and black-tailed godwit *Limosa limosa* in the Netherlands and the importance of predation on wader reproductive output. *Ibis*, 150 (Suppl. 1): 74-85.
- ³ Kleijn D., Schekkerman H., Dimmers W. J., van Kats R. J. M., Melman D. & Teunissen W. A. 2010. Adverse effects of agricultural intensification and climate change on breeding habitat quality of black-tailed godwits *Limosa l. limosa* in the Netherlands. *Ibis*, 152: 475-486.
- ⁴ Roodbergen M., van der Werf B. & Hötker H. 2012. Revealing the contributions of reproduction and survival to the Europe-wide decline in meadow birds: review and meta-analysis. *Journal of Ornithology*, 153: 53-74.
- ⁵ Groen N. M., Kentie R., de Goeij P., Verheijen B., Hooijmeijer J. C. E. W. & Piersma T. 2012. A modern Landscape Ecology of black-tailed godwits: habitat selection in southwest Friesland, The Netherlands. *Ardea*, 100: 19-28.
- ⁶ Roodbergen M., Klok C. & Schekkerman H. 2008. The ongoing decline of the breeding population of black-tailed godwits *Limosa l. limosa* in The Netherlands is not explained by changes in adult survival. *Ardea*, 96: 207-218.
- ⁷ Kentie, R., Both, C., Hooijmeijer, J. C. E. W., & Piersma, T. 2014. Age-dependent dispersal and habitat choice in black-tailed godwits (*Limosa l. limosa*) across a mosaic of traditional and modern grassland habitats. *Journal of Avian Biology*, 45(4): 396-405. DOI: 10.1111/jav.00273
- ⁸ Kentie, R. 2015. Spatial demography of black-tailed godwits: Metapopulation dynamics in a fragmented agricultural landscape. PhD thesis, University of Groningen.
- ⁹ Kleijn D., Berendse F., Smit R. & Gilissen N. 2001. Agri-environmental schemes do not effectively protect biodiversity in Dutch agricultural landscapes. *Nature*, 413: 723-725.
- ¹⁰ Márquez-Ferrando R, Figuerola J, Hooijmeijer JCEW, Piersma T 2014. Recently created man-made habitats in Doñana provide alternative wintering space for the threatened Continental European Black-tailed Godwit population. *Biol Conserv*, 171:127-135. doi: 10.1016/j.biocon.2014.01.022
- ¹¹ Lok, T. 2013. Spoonbills as a model system: a demographic cost-benefit analysis of differential migration. PhD thesis, University of Groningen.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit onderzoek is tweeledig: enerzijds het monitoren van de demografische parameters van een representatief deel van de Nederlandse grutto populatie, anderzijds het begrijpen van de processen die verantwoordelijk zijn voor veranderingen in deze parameters. Daarom richten we ons zowel op de processen die zich in het broedgebied afspelen als ook op de trek en in de overwinteringsgebieden.

We willen in het broedgebied meer inzicht krijgen in welke effecten gebiedsontwikkelingen en beheersmaatregelen hebben op de habitatkwaliteit en hoe zich dat door vertaalt in de overleving van nesten, kuikens en volwassen vogels.

Aangezien jonge vogels de sleutel zijn naar herstel van de populatie willen we ook meer weten over de bottlenecks die zij na het broedseizoen in en buiten Nederland tegenkomen. We willen daarom de trekroutes en overwinteringsgebieden van (jonge) vogels in kaart brengen en beter begrijpen waarom ze voor die plekken kiezen. Daarbij willen we kijken naar de rol van genen, sociale omgeving, geslacht, opgroeicondities en habitatkwaliteit.

Om deze brede doelstelling te bereiken zullen wij drie elkaar aanvullende methodes gebruiken om grutto's individueel te kunnen volgen: kleurringen, opkweek en zenderen. De onderzoekers die betrokken zijn bij dit project hebben veel ervaring met het kleurringen, opkweken en zenderen van jonge en adulte grutto's, alsook met de analyse van kleurring- en zendergegevens. Vanwege de voorgestelde combinatie van methodes, het bestaande netwerk van vrijwillige grutto-ring-aflezers en de reeds bestaande expertise op praktisch en analytisch gebied achten wij de haalbaarheid van dit project zeer hoog. Dat

laatste geldt ook voor de financiële haalbaarheid: de Provincie Fryslân heeft financiering toegezegd voor de periode 2017-2020 waarmee een groot deel van het onderzoek gefinancierd kan worden.

3.3 Belang

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

De grutto is onze nationale vogel, omdat geen enkele andere vogelsoort voor zijn voortbestaan zozeer afhankelijk is van Nederland. Friesland is een van de laatste bolwerken, en de provincie heeft zich daarom ten doel gesteld in 2020 tenminste 10.000 paar grutto's te huisvesten (Weidevogelnotitie 2014-2020). Door de snelle achteruitgang staat hij al jaren prominent als "gevoelig" op de Nederlandse Rode Lijst en als "near threatened" op de IUCN Red List. Ook de landelijke overheid trekt zich het lot van de weidevogels aan en zet zich al decennia in voor een herstel van de populatie. Na een jarenlange afname is het geen vanzelfsprekendheid dat dit gerealiseerd kan worden. Het voorgestelde onderzoek, dat voortbouwt op een 13 jarige onderzoekinvestering, richt zich op de vraag welke factoren hiervoor van doorslaggevend belang zijn. Dat gebeurt niet alleen door monitoring van aantalsontwikkelingen en de overleving van nesten, kuikens en volwassen dieren, maar ook door diepgaand onderzoek naar de achterliggende oorzaken daarvan. Daardoor voorziet het in een maatschappelijke behoefte naar onafhankelijke onderbouwing van het beleid. Het zenderonderzoek zal duidelijk maken welke gebieden langs de trekroute en in de overwinteringsgebieden essentieel zijn voor jonge en volwassen grutto's en aan het licht brengen of daar aanvullende beschermingsmaatregelen (zoals bv het sluiten van de jacht op grutto's in Frankrijk) nodig zijn.

Voor de culturele identiteit van Friesland is de relatie tussen bewoners en weidevogels van groot belang. In het dagelijks leven zijn er duizenden provinciegenoten die zich op diverse manieren met weidevogels verbonden voelen. Daar horen vogelaars bij, maar ook eierzoekers en nazorgers, jagers en wilsterflappers, dichters en musici. Weidevogels zijn een deel van de culturele identiteit van Friesland. Discussies over dit beladen onderwerp worden dan ook vaak gevoerd op basis van emotie, en juist in zo'n geval is het van groot belang om ook de feitelijkheden, verkregen door het voorgestelde monitoringwerk (en ingebed in verdiepend wetenschappelijk onderzoek van wereldformaat), in te brengen. Het gaat niet alleen om de grutto en de Kievit, maar het bredere besef van de bijzondere biodiversiteit dat van belang is. Dit werk helpt de bewustwording dat weidevogels niet slechts een natuur-belang vertegenwoordigen, maar juist ook een cultureel belang.

Friesland is qua landgebruik een landbouwprovincie: verduurzaming van de landbouw betreft niet alleen milieu of energievraagstukken (biogas, ammoniak, bodemdaling, waterkwaliteit), maar verduurzaming gaat ook over duurzaam land en bodemgebruik en het produceren van gezond en smakelijk voedsel. In toenemende mate ontdekken innovatieve boeren het grote belang van kruidenrijk hooi, geoogst op weidevogelvriendelijk beheerde graslanden. Meer natuurinclusieve benaderingen van landbouw zijn in ontwikkeling. Het is daarbij zoeken naar het beter inpassen van gebiedsspecifieke kenmerken in de bedrijfsvoering. Zowel grote spelers (o.a. Friesland Campina) als niche spelers (b.v. Tjolk) in b.v. de zuivelmarkt maken hier inmiddels stappen voorwaarts. Ook de veranderingen van het agrarisch natuurbeheer (vanaf 2016) vragen om een sterke analyse van de resultaten. Daarin is doorgaand onderzoek een belangrijke prikkel tot verbetering van het agrarisch natuurbeheer systeem, niet alleen in Friesland maar in heel Nederland.

Dit project heeft als fundamenteel wetenschappelijk belang dat het nieuwe inzichten verschaft over de mechanismen onderliggend aan metapopulaties: een complex van kern- en satellietpopulaties met onderlinge uitwisseling van individuen. Daarnaast komen we meer te weten over hoe een soort omgaat met antropogene invloeden op zijn habitat en er zijn ook aanwijzingen dat klimaatverandering een rol speelt in de achteruitgang van grutto's. Verder verwachten we dat het nieuwe inzichten verschaft over de mechanismen onderliggend aan (variatie in) trekgedrag en de keuze van stopover- en overwinteringsgebieden van trekvogels. Tot op heden is hierover nog heel weinig bekend, vanwege de logistieke beperkingen om vogels individueel te kunnen volgen. Klassieke verplaatsingsexperimenten

hebben laten zien dat er een genetische basis lijkt te zijn voor trekrichting en voor een endogeen gereguleerde klok die het begin en einde van de trekperiode bepaalt^{1,2}. Echter, voor de 'fine-tuning' van de trek, en de keuze van stopover- en overwinteringsgebieden, spelen omgevingsfactoren, zoals voedselomstandigheden en de aanwezigheid en het gedrag van soortgenoten, waarschijnlijk een belangrijke rol. Dit is één van de eerste studies wereldwijd die zich concentreert op de invloed van deze omgevingsfactoren op het trekgedrag en gebiedsgebruik van trekvogels, waarbij speciale aandacht zal worden besteed aan de sociale rol van de ouders en andere soortgenoten op het trekgedrag van jonge grutto's, en naar het effect van voedselomstandigheden, die de jonge grutto's in hun vroege leven en tijdens de trek ondervinden.

¹ Perdeck, A.C. 1958. Two types of orientation in migrating Starlings, *Sturnus vulgaris* L., and Chaffinches, *Fringilla coelebs* L., as revealed by displacement experiments. *Ardea*, 46: 1-37.

² Perdeck, A.C. 1964. An experiment on the ending of autumn migration in starlings. *Ardea*, 52: 133-139.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Om de doelstelling te bereiken zullen wij drie elkaar aanvullende methodes gebruiken om grutto's individueel te kunnen volgen: kleurringen, opkweek en zenderen. Met individuele kleurringcombinaties kunnen vogels hun leven lang op afstand worden herkend en gevolgd. Via eigen opkweek van gruttokuikens van ei tot vliegvlug kuiken leren we veel over de eisen die kuikens stellen aan hun opgroei-habitat. Tegelijkertijd kunnen we met de vergelijking tussen wilde kuikens en opkweekkuikens kijken naar het effect van genetische aspecten. Met zenders kunnen we de kuikens en hun ouders volgen tijdens het broedseizoen en daarbuiten. Het nadeel van kleurringen is dat het verzamelen van waarnemingen enorm arbeidsintensief en onvoorspelbaar is, wat inherent is aan veldonderzoek waarbij je altijd maar moet afwachten of je de vogel te zien krijgt, en je voor het beantwoorden van veel onderzoeksvragen daardoor veel dieren moet ringen om een voldoende grote steekproef te krijgen. Gezenderde vogels zijn veel voorspelbaarder waardoor je in het veld veel gericht onderzoek kunt doen. Het zenderen van vogels heeft echter ook nadelen: het is duur en het veroorzaakt meer ongerief (matig) dan alleen kleurringen. Door de combinatie van kleurringen en zenderen profiteren we van de voordelen van beide methoden en kunnen tegelijkertijd kijken in hoeverre vogels die uitgerust zijn met een zender zich anders gedragen of een lagere overleving hebben dan vogels met kleurringen om.

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

demografisch onderzoek (dierproeftype 1)

zenderen van adulte en juveniele grutto's (dierproeftype 2)

opkweken en zenderen van juveniele grutto's (dierproeftype 3)

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

Als onderdeel van het langlopende populatie-monitoringsonderzoek aan grutto's zijn de afgelopen 13 jaar meer dan 11.000 kuikens en volwassen vogels voorzien van een individuele kleurringcombinatie. Voor het zoeken, vangen en ringen hebben wij vergunningen op basis van artikel 75 en 114 van de Flora- en Faunawet. De vogels worden niet alleen geringd maar er worden ook biometrische gegevens verzameld en een bloedmonster genomen om zekerheid te hebben over het geslacht van elke vogel, wat in een demografische studie essentieel is. Het kleurringen stelt ons in staat om deze vogels hun leven lang als individu te herkennen zowel in het broedgebied als daarbuiten. Jaarlijks wordt de onderzoekspopulatie en het habitat in Zuidwest Friesland door een team van ervaren onderzoekers en assistenten intensief gemonitord. Daarnaast bestaat er inmiddels een groot netwerk van meer dan 1350 vogelaars in Nederland en langs de gehele trekweg die de kleurringen van deze grutto's aflezen. Aan de hand van deze kleurring-aflezingen krijgen we inzicht in o.a. overleving, partnerkeuze, dispersie, gebiedsgebruik en habitatkeuze, fenologische parameters (o.a. aankomst- en vertrekdatum in/uit het broedgebied), trekroute en overwinteringsplek en de onderlinge samenhang van al deze aspecten. We kunnen laten

zien of er daarin verschillen bestaan tussen mannen en vrouwen en of er een relatie bestaat met het reproductief succes en welke rol beheersmaatregelen daarin spelen.

Het zelf opkweken van jonge grutto's stelt ons in staat om inzicht te krijgen in de energiebehoefte van jonge grutto's en welke rol habitatkwaliteit daarin speelt. Gruttokuikens verlaten binnen 24 uur na de geboorte het nest en moeten dan zelf hun voedsel zoeken. Ze doen dit bij voorkeur in hoog gras en drukken zich op de grond of sluipen weg op het moment dat hun ouders waarschuwen voor gevaar. Hierdoor is het ondoenlijk om onder natuurlijke omstandigheden gestructureerde waarnemingen te doen aan foeragerende kuikens, laat staan ze dagelijks terug te vangen om hun conditie te meten. We willen kuikens habitat van verschillende kwaliteit aanbieden en meten wat dit betekent voor gewicht en groeisnelheid en detailinformatie verzamelen over hun prooikeuze en jachttechniek. Op basis hiervan kunnen we aanbevelingen doen welke beheersmaatregelen optimaal zijn voor opgroeiende gruttokuikens.

We zullen volwassen dieren en jonge dieren uit het wild, maar ook opgekweekte jonge dieren zenderen. Door het zenderen van wilde vogels verwachten we meer te weten te komen over voorkeurs habitat en actieradius van gruttogezinnen, waar ze na het vliegvlug worden van de kuikens heen gaan en hoe lang de band tussen ouders en kuikens in stand blijft. Voorafgaand aan de trek moeten de vogels sterk opvetten om de 5000 km lange reis te kunnen maken. Het is daarom van belang dat er in Nederland voldoende "opvetgebieden" zijn en te weten waar die liggen.

Uit het demografisch onderzoek blijkt dat vroeg geboren kuikens betere overlevingskansen hebben dan laat in het voorjaar geboren kuikens. De opkweekkuikens zijn van dezelfde leeftijd maar door deze in twee cohorten tenminste drie weken na elkaar los te laten willen we te weten komen of vroege kuikens een andere trekstrategie hebben of dit wellicht bijdraagt aan de betere overlevingskansen in hun eerste levensjaar.

Om een beter begrip te krijgen van de mechanismen onderliggend aan het trekgedrag van grutto's, willen we individuele grutto's volgen op hun trek en in de overwinteringsgebieden. Dit willen we doen door individuele grutto's te volgen door middel van kleurringen en zenders. De aflezingen van gekleurde grutto's geven ons een globaal idee over gebiedsgebruik en overleving, en welke invloed de vroege leefomstandigheden (zoals uitkomstdatum, dieet, lichaamsconditie) en het geslacht van de jongen hierop hebben. Het volgen van gezenderde individuen geeft ons de mogelijkheid om in veel meer detail te weten te komen welke gebieden individuen gebruiken, niet alleen overdag maar ook 's nachts (wanneer er geen waarnemingen aan gekleurde vogels gedaan kunnen worden), en ook in de gebieden die voor waarnemers niet/moeilijk toegankelijk zijn. We zullen zowel volwassen als jonge grutto's zenderen en deze in het veld proberen terug te vinden en zo informatie verzamelen over de omstandigheden die de gezenderde grutto's ondervinden in de verschillende gebieden tijdens de trek en op de overwinteringsplaatsen. Daarbij moet worden gedacht aan voedselaanbod, de aanwezigheid van andere grutto's en de groepssamenstelling van de trekgroep van een gezenderde grutto (verhouding juvenielen en adulten; gekleurde vogels in de groep waarvan mogelijk bekend is of het mannetjes of vrouwtjes zijn en waar ze overwinteren). Om deze informatie te kunnen verzamelen zal – naast het organiseren van expeditie langs de trekroute – ook het netwerk van vogelaars worden ingeschakeld. Door middel van een website zullen de gezenderde grutto's live te volgen zijn, waarop oproepen geplaatst zullen worden met het verzoek tot het verzamelen van gerichte informatie over de omgeving van de gezenderde grutto's.

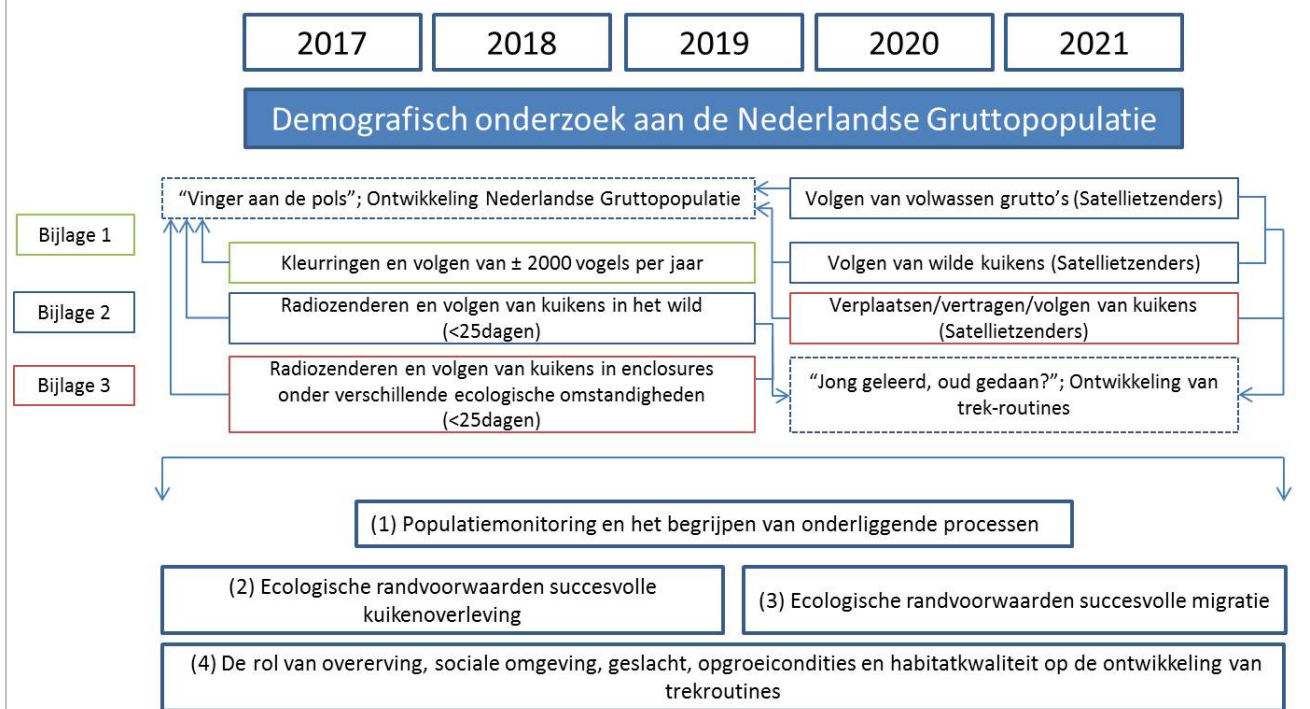
Het zenderen van kuikens en ouders geeft de mogelijkheid om te onderzoeken of kuikens met hun ouders meetrekken tijdens de eerste reis naar het zuiden en van hen de trekroute en overwinteringsplek overnemen. We verwachten dat dit niet zo is en kuikens zelfstandig trekken en dan kunnen we te weten komen of er wellicht een genetische component zit in de keuze voor route en stopplekken. Gezenderde opkweekkuikens kunnen niets van hun ouders leren en zij zullen hun route zelf moeten zoeken al dan niet door zich aan te sluiten bij andere grutto's. We zijn ook benieuwd in hoeverre trekrichting, -route en overwinteringsplek genetisch in de populatie verankerd zijn. Daarom willen we een deel van de opkweekkuikens op het moment dat ze vliegvlug zijn verplaatsen naar een Oost-Europese gruttipopulatie in Polen. Oost-Europese grutto's volgen een andere route en overwinteren oostelijker in

Afrika dan West-Europese grutto's.

Go / no go momenten:

- We hebben inmiddels 13 jaar ervaring met het nemen van een bloedmonster bij volwassen grutto's en kuikens. Er zijn geen aanwijzingen dat het nemen van het bloedmonster de overlevingskansen beïnvloedt. Van verzwakte individuen wordt geen bloedmonster genomen.
- De opkweek van grutto's vanuit het ei tot vliegvlug kuiken hebben we goed onder de knie en er is de afgelopen twee jaar weinig uitval geweest. We verwachten hier de komende jaren dan ook geen problemen.
- Tot op heden heeft onze groep meer dan >200 zenders aangelegd (radio en satelliet), dit maakt ons tot een van de meest ervaren onderzoeksgroepen in de wereld. Gegeven deze ervaring is het voor ons dan ook makkelijk om te zien of zenders enige vorm van impact hebben op de vogels. Omdat het zowel vanuit een welzijnsaspect als onderzoeksaspect belangrijk is dit tijdig te herkennen zijn wij dan ook constant bezig om deze technologie te verbeteren en de hinder voor een vogel tot een minimum te beperken.
- Indien de sterfte onder adulte gezenderde vogels meer dan drie keer zo hoog wordt als die onder de gekleurde vogels, zal onmiddellijk gestopt worden met het zenderen van adulte vogels totdat de oorzaak voor deze verhoogde sterfte is gevonden en kan worden aangepakt. Een dergelijk 'no-go moment' stellen we niet voor de jonge grutto's, omdat de natuurlijke jaarlijkse sterfte onder jonge vogels sowieso erg hoog is (ca. 60%), en grote jaarlijkse variatie vertoont.

Roadmap projectvoorstel:



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Bloedmonster
2	Bloedmonster en zenderen
3	Opkweken, bloedmonster, translocatie, zenderen
4	

5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Bloedmonster

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Als onderdeel van het langlopende populatie-monitoringsonderzoek aan grutto's zijn de afgelopen 13 jaar meer dan 11.000 kuikens en volwassen vogels voorzien van een individuele kleurringcombinatie. Voor het zoeken, vangen van vogels met inloopkooien en ringen hebben wij vergunningen op basis van artikel 75 en 114 van de Flora- en Faunawet. De vogels worden niet alleen geringd maar er worden ook biometrische gegevens verzameld

Het nemen van een bloedmonster is noodzakelijk om zekerheid te hebben over het geslacht van elke vogel, wat in een demografische studie essentieel is. Grutto's kunnen op basis van uiterlijke en biometrische kenmerken niet met zekerheid gesekst worden. Het nemen van een veermonster is daarnaast cruciaal omdat we hiervan de ratio van verschillende stabiele isotopen kunnen bepalen en daarmee kunnen achterhalen waar de vogel zijn veren geruid heeft.

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

Om een (volwassen) vogel te ringen, biometrische gegevens op te nemen, een veermonster te nemen en foto's te maken ben je ongeveer een 15-20 minuten bezig. Het nemen van een bloedmonster neemt minder dan 5% van die tijd in beslag en het ongerief daarvan is gering. Het afnemen van een bloedmonster gebeurt bij volwassen vogels en grote kuikens door een vleugelader aan te prikken en met een capillair maximaal 50 µl bloed op te zuigen dat vervolgens in 96 % alcohol wordt bewaard bij -80 C. Bij kleine kuikens wordt een pootader aangeprikt en wordt veel minder bloed afgenomen (< 10 µl). Het wondje wordt dichtgedrukt met watten en de vogel wordt niet losgelaten voordat het bloeden is gestopt.

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

Het onderzoeksgebied in Zuidwest Friesland is ruim 10.000 ha groot en huisvest een populatie van ruim 2000 vogels. Om individuele vogels te kunnen volgen worden ze gevangen en voorzien van een unieke

combinatie van gekleurde pootringen. De vogels zijn dan op afstand herkenbaar en behoeven niet opnieuw te worden gevangen om te weten met welk individu je te maken hebt en wat het geslacht van de vogel is. Veel vragen in ons onderzoek kunnen we dan ook beantwoorden door het volgen van de lotgevallen van deze individuele vogels. Migratie en mortaliteit (ongeveer 20% per jaar) zorgen er echter voor dat het noodzakelijk is om jaarlijks opnieuw vogels te vangen en te kleurringen om zo voldoende herkenbare vogels in de populatie over te houden. De overleving van kuikens tot broedvogel bedraagt echter in sommige jaren en/of deelgebieden minder dan 5%. Om uitspraken over reproductie te kunnen doen is het daarom nodig zo veel mogelijk jonge vogels te ringen om een voldoende grote steekproef over te houden, zeker als het gaat om onderzoeksvragen op het niveau van de individuele vogel of het evalueren van een specifieke beheersmaatregel.

B. De dieren

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

Grutto (*Limosa limosa limosa*); wilde populatie in Nederland; 2000 kuikens en volwassen dieren per jaar: 10.000 vogels in de periode 2017-2022.

De afgelopen jaren hebben we ongeveer 2000 vogels per jaar gevangen, waarvan >80% eendagskuikens. Met deze aantallen kunnen we de gekleurringde populatie op peil houden en betrouwbare demografische analyses doen. Het valt echter niet op voorhand te zeggen hoeveel vogels er worden gevangen en hoeveel en waar ze worden teruggezien.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

Het gaat om soortspecifiek onderzoek waardoor het alleen met deze soort uitgevoerd kan worden. Voor het nemen van een bloedmonster is er geen alternatief omdat in het veld niet met zekerheid onderscheid gemaakt kan worden tussen mannen en vrouwen.

Vermindering:

Sexebepaling is noodzakelijk voor vrijwel alle vragen binnen het demografisch onderzoek. Analyses worden beter naarmate de lotgevallen van meer individuen daarin kunnen worden meegenomen wat van belang is een studie waarin waarneemkans van individuen een grote rol speelt. Bovendien is het mogelijk de analyses meer in detail uit te voeren naarmate de lotgevallen van meer individuen bekend zijn. In het begin van dit onderzoek was er daarom een focus op het vangen van zo veel mogelijk individuen om zo snel mogelijk een gekleurringde populatie op te bouwen. Er zijn nu echter in de meeste delen van het studiegebied voldoende gekleurringde volwassen individuen in de populatie waardoor we in die gebieden streven naar consolidatie door ongeveer net zo veel nieuwe vogels te vangen als er door natuurlijke sterfte uit de populatie verdwijnen (ongeveer 20%). De aantallen gevangen adulte vogels nemen daardoor af.

Verfijning:

Om een vogel te ringen en biometrische gegevens op te nemen ben je ongeveer een 15-20 minuten bezig. Het nemen van een bloedmonster neemt minder dan 5% van die tijd in beslag en het ongerief daarvan is gering.

Het afnemen van 50 µl op zich is geen probleem voor de vogel; als vuistregel wordt bij dit type onderzoek aangehouden dat je bij bloedafname zonder probleem 1 % van het lichaamsgewicht van de vogel kan afnemen.

De monsters worden in het veld genomen op de vangplek. Hierdoor is de vogel na afloop zo snel mogelijk terug in zijn vertrouwde omgeving.

Bloedmonsters worden afgenomen voor het nemen van de biometrie. Hierdoor is het bloeden vrijwel altijd gestopt als alle handelingen verricht zijn en kan de vogel meteen worden losgelaten. Een DNA monster kan ook worden verkregen door het plukken van enkele veren maar dit is zeker pijnlijker voor de vogel.

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

In aan aanvulling op wat hierboven onder Verfijning is vermeld kan nog worden gezegd dat volwassen vogels gevangen worden vlak voor het uitkomen van de eieren. Door dit in een zo laat mogelijk stadium van het broeden te doen, wordt de kans op verlating van het legsel verkleind en de kans op een succesvolle vangpoging vergroot. Vogels worden niet gebloed als ze te zwak zijn (bv. kuikens in slechte conditie), gewond zijn of tekenen van ernstige stress vertonen (bv poot- of vleugelkramp).

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Er is geen ander langjarig demografisch onderzoek aan grutto's en het gaat er juist om de ontwikkelingen van de populatie te monitoren.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De grutto's leven in het wild

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

De proef vindt plaats in het wild en zal worden uitgevoerd in Zuidwest Friesland.

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

Er is gekozen voor dit gebied, omdat wij hier al voor meer dan 10 jaar grutto's volgen en er reeds een hoge kleuring-dichtheid is van adulte vogels die al voor meerdere jaren gevolgd zijn.

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het injecteren van de verdoving zal meer stress/ pijn opleveren dan de bloedafname. Bovendien is pijnstilling ongewenst, omdat dit de alertheid en daarmee de veiligheid van de vogels die in het wild leven kan beïnvloeden.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vanwege de handeling van het vangen, het tijdelijk gevangen houden en de handelingen tijdens het kleurringen en bemonsteren.

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

De adulte vogels worden gevangen vlak voordat de eieren uitkomen. Hiermee wordt de kans geminimaliseerd dat het nest verlaten wordt na de vangst van de oudervogel. De adulte vogels krijgen bovendien een doek over hun kop tijdens de handelingen, om ze zo rustig mogelijk te houden.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	2	Bloedmonster en zenderen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Wij willen juveniele en adulte grutto's uitrusten met zenders (radiozenders op kuikens en satellietzenders op uitgevlogen juvenielen en hun ouders) om zo informatie te verkrijgen over: 1) hoe grutto's het Nederlandse polderlandschap benutten en hoe kuikens zich daar ontwikkelen, 2) de timing, route en overleving van de trek van zowel juvenielen als adulten. Ook willen we een klein bloedmonster afnemen voor geslachtsbepaling.

Het gedrag en de ontwikkeling van de kuikens (dieet, groei, verplaatsingen, overleving) willen we relateren aan habitat (type, hoogte en dichtheid vegetatie, waterpeil en beheer), voedselaanbod (aantal, soort en timing beschikbaarheid van insecten) en predatiedruk (aantal, soort en timing aanwezigheid van predatoren). Daarnaast willen we begrijpen in welke mate 1) gedrag en ontwikkeling in de kuikenfase, 2) de omgeving waarin ze opgroeien voor en na het uitvliegen, en 3) de trek-routine van de ouders, van invloed zijn op de ontwikkeling van de trek-routines van deze juveniele vogels. Zo kunnen we beantwoorden in hoeverre de omgeving, maar ook de genetische en sociale overerving het trekgedrag van juveniele grutto's beïnvloedt.

Wij hebben in 2015 en 2016 al ervaring opgedaan met dit experiment. In die jaren zijn veel juveniele grutto's tijdens de kuikenfase, maar ook na het uitvliegen een "normale" (predatie, verhongering, na agrarische activiteit) dood gestorven. We hebben grote verschillen in overleving waargenomen tussen de jaren. Dit heeft gezorgd voor kleinere steekproeven en grotere variantie, en dus minder verklarend vermogen. Daarom willen we dit experiment herhalen om zo het geobserveerde verschil te kunnen verklaren. 19 van de 26 in 2015 en 2016 gezenderde adulten zijn nog in leven. We willen een paar (6-8) adulten (afhankelijk van de overleving deze winter) en 40 uitgevlogen juvenielen zenderen. Omdat we de afgelopen 2 jaar hebben vastgesteld dat predatie de belangrijkste doodsoorzaak van kuikens is, gaat de

beheerder van het studiegebied volgend jaar een raster plaatsen rondom het studiegebied om de belangrijkste predatoren buiten te sluiten. Wij hebben daarom goede hoop dat de kuikenoverleving weer hoog zal zijn (zoals in 2013 en 2014) en het voorgestelde experiment succesvol (meten van andere dingen dan predatie, grotere steekproef) zal verlopen.

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

Gruttokuikens verlaten na de geboorte binnen 24 uur het nest maar je kunt gruttogezinnen opsporen door goed naar het gedrag van de oudivogels te kijken die de kuikens begeleiden. De kuikens zullen worden gevangen en gebloed in de pootader (10µl) en 2 kuikens van elk nest worden voorzien van een radiozender. Deze radiozender wordt op het dons van de rug geplakt met secondelijm en maakt het mogelijk om de kuikens gedurende de kuikenfase (25dagen) te volgen. We bepalen de locatie elke 3 dagen vanaf een afstand (door de radiozender uit te peilen) en vangen de kuikens elke 5 dagen om groei en dieet vast te stellen (d.m.v. een poepmonster) en de zender zo nodig bij te lijmen. Per gruttogezin duurt deze procedure telkens 10-15 minuten.

Als een kuiken 25 dagen oud is vliegt het bijna uit en op dit moment verwijderen we de radiozender en geven we het kuiken een satellietzender (5 gram); deze wordt d.m.v. een leg-loop harnas op de rug geplaatst. Dit kost tussen de 5-10 minuten.

De adulte vrouwtjes worden op het nest gevangen en gebloed in de vleugelader (50µl) waarna de zender (9.5 gram) wordt geplaatst d.m.v. een leg-loop harnas. Het omdoen van het harnas kost een extra 5 minuten.

Het lijmen van zenders op de rug en het terugvangen van kuikens is de afgelopen 2 jaar goed verlopen en is in het verleden ook succesvol toegepast bij grutto's¹. De leg-loop methode is de minst ingrijpende methode om langdurig te zenderen (zie ook verfijning) en heeft bij grutto's¹ en marmergrutto's² al goede resultaten opgeleverd. 25 dagen oude juvenielen wegen rond de 200g en adulte vrouwtjes wegen rond de 325g, deze zenders (5g en 9,5g) wegen dus minder dan de voorgeschreven 5% van het lichaamsgewicht.

¹ Teunissen, W., Schekkerman, H., Willems, F. and Majoor, F. (2008), Identifying predators of eggs and chicks of Lapwing *Vanellus vanellus* and Black-tailed Godwit *Limosa limosa* in the Netherlands and the importance of predation on wader reproductive output. *Ibis*, 150: 74–85. doi:10.1111/j.1474-919X.2008.00861.x

² Senner, N. R., Verhoeven, M. A., Abad-Gómez, J. M., Gutiérrez, J. S., Hooijmeijer, J. C. E. W., Kentie, R., Masero, J. A., Tibbitts, T. L. and Piersma, T. (2015), When Siberia came to the Netherlands: the response of continental black-tailed godwits to a rare spring weather event. *J Anim Ecol*, 84: 1164–1176. doi:10.1111/1365-2656.12381

³ Olson BE, Sullivan KA, Farmer AH (2014) Marbled godwit migration characterized with satellite telemetry. *Condor* 116:185–194. doi:10.1650/CONDOR-13-024.1

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

We zijn geïnteresseerd in welke rol opgroeiomstandigheden (gedrag en habitat), sociale omgeving (groepsgrootte en -samenstelling), fysieke omgeving (datum van vertrek, weer en wind), en genetische achtergrond (sekse van de juveniele vogel, trekpatroon ouders) hebben op de ontwikkeling van de timing en trekroute van juveniele grutto's.

Opgroei gedrag wordt gekwantificeerd als ruimtegebruik (home range) en is een continue variabele.

Opgroei habitat wordt uitgedrukt als een samengestelde variabele die insectenaanbod, vegetatie, waterpeil en beheer samenvat en is een continue variabele. De sociale omgeving wordt uitgedrukt in 2 variabelen: groepsgrootte en verhouding adulte en juveniele vogels in de groep. De "fysieke" omgeving wordt beschreven door uitvliegdatum en windomstandigheden. De genetische achtergrond wordt beschreven door sekse (man/vrouw) en overwinteringsgebied van de ouders (Iberia/Afrika).

Wij willen de trek (vertrekdatum, tussenstops, tijdsduur, bestemming) relateren aan opgroeien (2 covariaten), sociale omgeving (2 covariaten), uitvliegdatum (1 covariaat), wind (1 covariaat), geslacht (2 opties) en overwinteringsgebied van de ouders (2 opties). Bij meer dan 6 te schatten modelparameters is de richtlijn dat er minimaal 10 individuen gevolgd moeten worden per te schatten parameter om robuuste parameter- schattingen te krijgen¹. In ons geval zijn dit 8 parameters, dus zijn er 80 individuen nodig om deze parameters goed te schatten.

In 2015 en 2016 hebben we 160 juveniele grutto's gezenderd met een satellietzender. Van 35-40% (afhankelijk van de einddatum) van deze individuen (55-64) hebben we de eerste zuidwaartse trek kunnen volgen. Dat is veel lager dan verwacht; we hadden verwacht na 2 jaar al genoeg individuen gevolgd te hebben voor deze analyse), maar de overleving van in het wild levende kuikens was vele malen lager dan verwacht. Het feit dat we nog zoveel juvenielen hebben kunnen volgen kwam door het succes met het opkweken in gevangenschap (zie dierproef 3) waardoor we toch voldoende kuikens met een zender op pad hebben kunnen sturen.

We willen op zijn minst nog 25 individuen volgen binnen één jaar. We zouden dit graag al in 2017 willen doen, maar als we onverhoopt geen veldwerk kunnen/mogen doen in 2017 (bijv. door vogelgriep). Dan voor 2021. Als we uitgaan van dezelfde overleving als in 2015 en 2016 (35-40%) moeten we nog 74 individuen zenderen wat goed overeenkomt met de 80 (totaal in dierproef 2 + 3) die we voornemens zijn.

¹ Green, S.B. (1991) How many subjects does it take to do a regression analysis? *Multivariate Behavioral Research*, **26**, 499-510.

B. De dieren

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

Grutto (*Limosa limosa limosa*); wilde populatie in Nederland.

Zoals hierboven vermeld willen we 40 juvenielen in het wild (dierproef 2) en 40 opgekweekte juvenielen (dierproef 3) met een zender uitrusten. Hieronder wordt uiteengezet hoeveel dieren er gebruikt worden om 40 juvenielen en hun ouders in het wild uit te kunnen rusten met een zender (dierproef 2).

Aantallen: Het aantal kuikens dat we moeten volgen om 40 individuen in het wild te zenderen, hangt sterk af van de kuikenoverleving. In 2015 en 2016 hadden we het benodigde aantal dieren berekend gebruikmakend van de overleving in 2013 en 2014. De predatie in 2015 en 2016 was echter vele malen hoger dan in 2013 en 2014 waardoor we de minimale steekproefgrootte niet gehaald hebben. Komend jaar gaat de beheerder van het studiegebied het gebied (elektrisch) uitrasteren om predatoren buiten te houden (een methode die op andere plekken succesvol is¹) en wij verwachten dat de kuikenoverleving daardoor net zo hoog of zelfs hoger zal zijn als in 2013-2014. Ook moeten we waarschijnlijk een aantal adulten (ouders) "bij-zenderen" afhankelijk van hun overleving tot het broedseizoen; een jaarlijkse sterfte van 15-20% is gebruikelijk bij grutto's.

Een grutto heeft op de dag van uitkomen 4 kuikens (legt 4 eieren). In 2013-2014 was de overleving van deze kuikens tot dag 25: 35-40%. In een jaar met goede overleving moeten we dus tenminste 100 kuikens volgen om er 40 een zender te kunnen geven op dag 25. Wij willen daarom de kuikens van 25 nesten volgen en geven steeds 2 van deze kuikens een radiozender (in totaal dus 50 kuikens met zender en bloedmonster). Door de ouders en 2 kuikens te volgen, volgen we indirect de hele familie (nog eens 50 kuikens, zonder zender, maar wel een bloedmonster).

In een jaar met slecht uitvliessucces zijn er op dag 25 ($100 \cdot 0.35$) 35 kuikens van de oorspronkelijke 25 nesten in leven. In dat geval worden er 5 jongen van 25 dagen oud "bijgezenderd" (bloedmonster en satelliet zender), om zo tot een totaal van 40 te komen.

Samenvattend:

- Uitval van gezenderde adulten die in 2016 nog in leven waren: maximaal 8 adulten "bij-zenderen".
- 50 kuikens: radiozender + bloedmonster, waarvan 20 een satelliet zender.
- 50 kuikens: bloedmonster (geen radiozender), waarvan 20 een satelliet zender.
- Mogelijk 5 kuikens "bijgezenderd" (satellietzender + bloedmonster) in slecht broedseizoen.

Totaal: $8+50+50+5= 113$ grutto's

¹ Malpas, L.R., Kennerley, R.J., Hiron, G.J.M., Sheldon, R.D., Ausden, M., Gilbert, J.C. & Smart, J. 2013. The use of predator-exclusion fencing as a management tool improves the breeding success of waders on lowland wet grassland. *J. Nat. Conserv.* 21: 37-47.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: We zijn geïnteresseerd in het trekgedrag van de grutto en kunnen daarom geen andere soort kiezen. Waarom wij grutto's bestuderen is uiteengezet in ons projectvoorstel. Zenders zijn noodzakelijk om data met de benodigde resolutie te krijgen. Met traditioneel kleuring-onderzoek kunnen we de overleving in bepaalde gebieden schatten, maar kunnen we niet aangeven waarom een kuiken doodgaat. Met de radiozenders kunnen we dat wel onderzoeken: waarom sommige kuikens overleven en anderen niet. Kleurring-onderzoek kan ons ook helpen de trek van individuen te begrijpen, maar geeft ons slechts af en toe een datapunt en eigenlijk nooit uit Afrika; dit is lang niet gedetailleerd genoeg om de ontwikkeling van de trek te begrijpen. Ook kan je zonder zenders geen verschil maken tussen mortaliteit en dispersie, wat van groot belang is voor dit onderzoek. We kunnen dus niet anders dan grutto's en zenders gebruiken.

Vermindering: Voor overweging van de aantallen te zenderen juveniele en adulte vogels, zie de uitleg onder de kopjes 'Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken' van onderdeel A en "noem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes." van onderdeel B. Vermindering van de aantallen zal dus leiden tot ongewenste vermindering in statistische power.

Verfijning: Het kan niet anders dan dat de vogels enige hinder ondervinden van de zender en wij gebruiken daarom de lichtst beschikbare zender van de hoogste kwaliteit.

- Adulten worden 1-2 dagen voor het uitkomen gevangen om het verlatingsrisico te minimaliseren tot minder dan 1%.
- De satellietzenders op de kuikens zijn zo licht mogelijk. We zouden ook de goedkopere 9.5g zware zenders op kuikens kunnen gebruiken, maar we hebben ervoor gekozen behoorlijk te investeren in de lichtere 5g-zenders.
- De radiozenders zijn zo licht mogelijk. We hadden de goedkopere zenders van 1.2g kunnen gebruiken, maar ook hier hebben we geïnvesteerd in lichtere zenders van 0.9g. Het plakken heeft geen nadelige gevolgen. Als we een kuiken onverhoopt niet terugvinden valt deze af zodra de veren doorkomen.
- We hebben ondertussen veel ervaring met het zenderen van juveniele grutto's. Dat hebben we gedaan met full-body harnas en leg-loop harnas. En we weten nu dat een leg-loop harnas beter werkt en weten precies hoe groot het moet zijn voor een juveniel.
- Het afnemen van 10 µl (kuikens) of 50 µl (adulten) op zich is geen probleem voor de vogel; als vuistregel wordt bij dit type onderzoek aangehouden dat je bij bloedafname zonder probleem 1 % van het lichaamsgewicht van de vogel kan afnemen.
- We verminderen de stress van de vogels door ze zo snel mogelijk te behandelen en ze in een donker zakje te houden.

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

In aan aanvulling op wat hierboven onder Verfijning is vermeld kan nog worden gezegd dat volwassen vogels gevangen worden vlak voor het uitkomen van de eieren. Door dit in een zo laat mogelijk stadium van het broeden te doen, wordt de kans op verlaten van het legsel verkleind en de kans op een succesvolle vangpoging vergroot.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Onze onderzoeksgroep heeft dit experiment in 2015 en 2016 al gedaan. De predatie van zowel de kuikens en juvenielen uitgerust met zender als de kuikens en juvenielen zonder zender, was in beide jaren zeer hoog wat heeft geleid tot een kleiner dan verwachte steekproefgrootte om de geobserveerde variantie te verklaren. Daarom moeten we het experiment nogmaals doen om zo de benodigde steekproefgrootte te behalen.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De grutto's leven in het wild

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

De proef vindt plaats in het wild onder verantwoordelijkheid van vergunninghouders (ringvergunning en 'Artikel 9' WOD), en zal plaatsvinden in zuidwest-Friesland [REDACTED]

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

Er is gekozen voor deze polder, omdat dit de best bestudeerde polder in ons studiegebied is met een hoge grutto-dichtheid, kleurring-dichtheid, adulten met zenders en al 4 jaar aan gedetailleerde habitat-data.

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Wij verwachten alleen dat er alleen een vorm van pijn kan optreden bij de afname van bloed. Het injecteren van een verdoving zal cumulatief meer stress/ pijn opleveren dan de bloedafname alleen. Vanuit dit oogpunt is het dus niet wenselijk om de vogels te verdoven voor een bloedafname. Gedurende de rest van dit experiment is het niet de verwachting dat kuikens enige vorm van pijn ondervinden.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress en mogelijk een lagere overleving als predatoren zich richten op vogels met een zender, doordat ze wat meer uitgeput zijn of opvallen door de zender. Tot nu toe hebben we geen verschil in de overleving van kuikens met zender of zonder zender waargenomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress als gevolg van de handelingen en onwennigheid door het krijgen van een zender op de rug. Verder moet de zender worden megedragen wat meer energie kost en ook de snelheid van de vogel kan beïnvloeden. Verwacht wordt dat met name het opstijgen moeilijker is en de predator (zoals een slechtvalk) daar gebruik van kan maken.

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

De beste manier om stress te verlichten is om de handeling te verkorten en de vogel zo snel mogelijk weer los te laten op de plek waar je hem gevangen hebt. Het zenderen gebeurt daarom altijd in een team van 3 (1 doet het harnas, 1 houdt de vogel vast en de andere schrijft en geeft materialen aan). Verder proberen we stress te minimaliseren door de vogels (meestal de kop) in een donker zakje te houden.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Matig voor kuikens en adulten die gebloed worden en een zender krijgen. Licht voor kuikens die alleen gebloed worden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>Opkweken, bloedmonster, translocatie, zenderen</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Opkweken, bloedmonster, translocatie, zenderen
Volgnummer	Type dierproef				
3	Opkweken, bloedmonster, translocatie, zenderen				

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Zoals beschreven in de hoofdaanvraag zijn wij vanuit ons demografisch werk geïnteresseerd geraakt in de ontogenie van migratie bij grutto's. Geobserveerde veranderingen in trekroutes, timing en overwinteringsgebied lijken namelijk niet alleen verklaard te kunnen worden door louter en alleen de genetische achtergrond van een individu. Om dit te kunnen onderzoeken zullen wij naast dierproef 2, een klassiek verplaatsingsexperiment uitvoeren¹. Hiermee kunnen wij testen of genetisch vergelijkbare individuen in een sociaal andere omgeving waarvan trekroutes, timing en overwinteringsgebieden verschillen zich gedragen naar hun genetische achtergrond of in staat zijn gebruik te maken van sociale informatie.

Omdat zelfs de vroege sociale omgeving (niet vliegvlugge periode) al een effect kan hebben op het ontwikkelingen van bepaalde routines is het dus noodzakelijk om individuen te laten opgroeien in een sociaal identieke omgeving. Daarom is het cruciaal dat wij grutto's in gevangenschap laten opgroeien, waarin de sociale omstandigheden voor alle individuen gelijk zijn en een verplaatsings- en verdragings-experiment op latere leeftijd moet zorgen voor variatie in die sociale omgeving. In deze proef zullen wij daarom een nader te omschrijven aantal grutto's opkweken en vervolgens op 2 verschillende plekken in tijd en ruimte loslaten. Deze met satellietzenders uitgeruste en uitgevlogen juveniele grutto's zullen ons vervolgens inzicht geven over de timing, locatie, oriëntatie en overleving van trek van juveniele grutto's onder verschillende sociale omstandigheden. En daarnaast hopen we te begrijpen in welke mate de ontwikkeling tijdens de kuikenfase (gedrag, groei) van invloed zijn op de ontwikkeling van trek-routines van deze juveniele grutto's. Door dit experiment tegelijkertijd uit te voeren met dierproef 2 kunnen we beantwoorden in hoeverre de omgeving, maar ook de genetische en sociale overerving het trekgedrag van de juveniele grutto's beïnvloedt.

Complementair aan het feit dat wij grutto-kuikens in gevangenschap hebben kunnen wij gedurende de

eerste 25 levensdagen van een grutto-kuiken, exacte metingen doen aan de groei en ontwikkeling van kuikens in verschillende grasland-types. Deze metingen zijn cruciaal om ons begrip omtrent juiste opgroeiomstandigheden te vergroten en overheden en particulieren kennis te verschaffen omtrent beheersmaatregelen voor geschikt opgroei-land voor grutto-kuikens. Gedurende de eerste 25 dagen zullen we daarom metingen verrichten aan de groei van kuikens in verschillende graslandpercelen. Deze ontwikkeling van dieet, groei en beweging zal gekoppeld worden aan het habitat (type, hoogte en dichtheid vegetatie, waterpeil en beheer) en voedselaanbod (aantal, soort en timing aanbod van insecten).

¹ Perdeck A.C. (1958) Two types of orientation in migrating starlings, *Sturnus vulgaris* L., and chaffinches, *Fringilla coelebs* L., as revealed by displacement experiments. *Ardea* 46:1-37

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

Verzamelen van eieren

In ons studiegebied in Zuidwest-Friesland zullen wij van 18 volledige grutto-nesten alle vier eieren rapen, in totaal zijn dit dus 72 eieren. Om ervoor te zorgen dat de eieren op hetzelfde moment uitkomen en de kuikens gedurende het gehele experiment een vergelijkbare leeftijd hebben, rapen wij alleen nesten die binnen een marge van 2 dagen gelegd zijn. Geraapte eieren mogen daarnaast niet langer dan een week bebroed zijn, ervaring leert ons dat dit het uitkomstpercentage van de eieren verhoogd. Eieren worden uitgebroed worden in een broedmachine. Gedurende de gehele broedperiode zal een temperatuur van 37.3-37.5 graden aangehouden worden en een luchtvochtigheid van 55-60%, daarnaast worden de eieren continu gedraaid. 3 dagen voor het uitkomen wordt de luchtvochtigheid verhoogd naar 80% en zullen de eieren niet meer gedraaid worden, dit zorgt ervoor dat kuikens 'makkelijk' uit het ei komen.

Huisvesting van kuikens

Uitgekomen kuikens zullen gedurende de eerste 8 uur in de broedmachine worden gehouden zodat ze goed opdrogen, omdat kuikens tijdens de eerste 24 uur alleen energie halen uit hun dooierzak bieden we tijdens deze periode alleen een ad libitum hoeveelheid water aan. Opgedroogde uitgekomen kuikens worden individueel herkenbaar gemaakt met kleurringen en zullen door middel van observaties gelinkt worden aan het ei waar ze uitgekomen zijn; daarnaast worden de kuikens op dit moment gebloed om de sekse van elk individu te bepalen en de genetische verwantschap ten opzichte van elkaar. Kuikens zullen gebloed worden in een pootader en worden ongeveer 10 µl bloed afgenomen. Het wondje zal tot het gestopt is met bloeden worden dichtgedrukt met watten. Kuikens worden in een hok van 2.5m bij 2.5m (6.25m²) geplaatst; water en voer (Micro lund¹ en levende insecten) zullen ad libitum aangeboden worden in ronde open bakken. Daarnaast is er de mogelijkheid voor de vogels om in een derde bak met alleen water te badderen. In een hok zullen maximaal 9 kuikens verblijven (gem. opp. per kuiken: 0.69m²). Gedurende de eerste 14 dagen zal er een warmtelamp in het verblijf hangen, door de hoogte en daardoor de kracht van de lamp gelijkmatig af te bouwen zullen de kuikens afgehard worden en wordt er zoals in het wild vanaf dag 7 bijna geen gebruik meer gemaakt van de lamp². De kuikens zijn immers vanaf dag 7 ook thermoneutraal². Water en voer wordt in ieder geval twee maal daags verversd en indien nodig vaker. De hokken zullen eenmaal daags verschoond worden. Vanaf dag 25 zullen de kuikens vliegvlug zijn en zullen de kuikens gehuisvest worden in een vliegkooi van 12m lang 6.80m breed en 3.5 meter hoog. In deze ruimte zal ruimte gemaakt worden voor een vijver; dit water zal constant verversd worden. Het voedsel zal nu naast de eerder beschreven voedseltypes ook bestaan uit regenwormen die in verschillende bakken aangeboden worden in een laag aarde.

Tijdens de gehele huisvestingsperiode zullen de lichtomstandigheden gelijk zijn aan de natuurlijke lichtomstandigheden.

Welzijnsmonitoring

Om het welzijn en de groei van de kuikens te kunnen monitoren worden de kuikens elke ochtend gemeten (snavel, snavel+kop, vleugel, tarsus en tarsus-toe), gewogen en visueel geïnspecteerd op in onderdeel 'J. Humane eindpunten' beschreven onderdelen. Daarnaast zal elk kuiken op dag 6 van een kleine radiozender (0.62g) voorzien worden. Deze zender wordt op een kleurring geplakt, hierdoor is het kuiken in het veld snel te vinden en verminderen we de stress tijdens het terugvinden van kuikens (zie volgende paragraaf).

Fourageexperiment

Vanaf leeftijdsgedag 7 tot leeftijdsgedag 25 zullen gedurende de dag (8u-17u) gruttokuikens in gerandomiseerde groepen van 5*8 kuikens (totaal 40 kuikens) naar 5 door ons opgezette enclosures gaan. Deze enclosures bevinden zich op 5 verschillende vegetatietypes (beheerspercelen). Elk kuiken zal dus gemiddeld eens per 2 dagen naar buiten gaan. De enclosures zijn 50m bij 50m (2500m²) groot en bestaan uit 70cm hoog kippengaas. Gedurende het verblijf in de enclosures zal er tenminste 1 persoon aanwezig zijn om het gedrag van de kuikens te monitoren en eventueel aanwezige predatoren te verjagen. Aan het einde van de dag zullen de kuikens teruggevangen en gewogen worden om de gewichtstoename/afname gedurende de dag te kunnen berekenen. Het transport van de kuikens vindt plaats in goed geventileerde, ruime individuele kratten waarvan de bodem bestaat uit dagelijks ververste doeken, hierdoor kunnen de kuikens maximale grip op de ondergrond uitoefenen en worden verwondingen en/of kramp voorkomen. Kuikens zijn alleen visueel van elkaar gescheiden. Dit laatste is belangrijk omdat we tijdens het transport van elk individu een poepje verzamelen waarmee we het dieet kunnen bepalen.

Translocatie experiment

Als de kuikens 25 dagen oud zijn (~200g) geven we 40 kuikens uit 10 verschillende nesten een satellietzender van 5g, deze zender wordt bevestigd d.m.v. een leg-loop harnas. Dit kost tussen de 5-10 minuten. De leg-loop methode is de minst ingrijpende methode van lange termijn zenderen (zie ook verfijning) en heeft bij grutto's³ en marmergrutto's⁴ al goede resultaten opgeleverd. 25 dagen oude juvenielen wegen rond de 200g; de zenders wegen dus minder dan de voorgeschreven 5% van het lichaamsgewicht. Op leeftijdsgedag 27 zullen een tiental vliegvlugge kuikens in ons onderzoeksgebied in Zuidwest-Friesland losgelaten worden, tegelijkertijd zullen er op die leeftijdsgedag 10 kuikens losgelaten worden in Polen (Burdy). De 10 kuikens die naar Polen worden verplaatst zullen vervoerd worden in een autobus waarin ruimte is voor 10 individuele kratten van 30cm bij 45cm, deze kratten zullen voorzien worden van zachte bekleding zodat verwondingen uitgesloten zijn. Vervoer zal plaatsvinden gedurende de nacht zodat we de effecten van de reistijd en de kans op vertraging door verkeersdruk tot een minimum kunnen beperken. Daarnaast zal het vervoer plaats vinden onder gecontroleerde temperatuur-omstandigheden van 15 graden; ervaring leert dat dit pootkramp voorkomt en zo het comfort verhoogt. Zowel in Nederland als Polen zullen de kuikens in de ochtend losgelaten worden, dit geeft de vogels de mogelijkheid om zich visueel goed te oriënteren gedurende de eerste dag. Vogels worden losgelaten nabij geschikte wetlands waarbij tijdens het eerste loslaatmoment volwassen soortgenoten aanwezig zijn en voor de tweede groep alleen andere juveniele soortgenoten aanwezig zijn. Na 3 weken zal deze tweede groep van tweemaal 10 vogels op dezelfde wijze en op dezelfde plek losgelaten worden. De 'overige' vogels die geen zender hebben gekregen zullen zowel tijdens de eerste als de tweede loslaatmoment losgelaten worden.

¹<https://www.lundi-germany.de/lundi-micro.html#horizontalTab2> (geraadpleegd op 17-11-2016)

²Schekkerman H. Boele A. (2009) Foraging in precocial chicks of the black-tailed godwit *Limosa limosa*: vulnerability to weather and prey size.

³Senner, N. R., Verhoeven, M. A., Abad-Gómez, J. M., Gutiérrez, J. S., Hooijmeijer, J. C. E. W., Kentie, R., Masero, J. A., Tibbitts, T. L. and Piersma, T. (2015), When Siberia came to the Netherlands: the response of continental black-tailed godwits to a rare spring weather event. *J Anim Ecol*, 84: 1164–1176.

⁴Olson B.E., Sullivan K.A., Farmer A.H. (2014) Marbled godwit migration characterized with satellite telemetry. *Condor* 116:185–194.

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

We zijn geïnteresseerd in welke rol opgroeiomstandigheden (gedrag en habitat), sociale omgeving (groepsgrootte en -samenstelling), fysieke omgeving (datum van vertrek, weer en wind), en genetische achtergrond (sekse van de juveniele vogel, trekpatroon ouders) hebben op de ontwikkeling van de timing en trekroute van juveniele grutto's.

Opgroeigedrag wordt gekwantificeerd als ruimtegebruik (home range) en is een continue variabele.

Opgroeihabitat wordt uitgedrukt als een samengestelde variabele die insectenaanbod, vegetatie, waterpeil en beheer samenvat en is een continue variabele. De sociale omgeving wordt uitgedrukt in 2 variabelen: groepsgrootte en verhouding adulte en juveniele vogels in de groep. De "fysieke" omgeving wordt beschreven door uitvliegdatum en windomstandigheden. De genetische achtergrond wordt beschreven door sekse (man/vrouw) en overwinteringsgebied van de ouders (Iberia/Afrika).

Wij willen de trek (vertrekdatum, tussenstops, tijdsduur, bestemming) relateren aan opgroeien (2 covariaten), sociale omgeving (2 covariaten), uitvliegdatum (1 covariaat), wind (1 covariaat), geslacht (2 opties) en overwinteringsgebied van de ouders (2 opties). Bij meer dan 6 te schatten modelparameters is de richtlijn dat er minimaal 10 individuen gevolgd moeten worden per te schatten parameter om robuuste parameter- schattingen te krijgen¹. In ons geval zijn dit 8 parameters, dus zijn er 80 individuen nodig om deze parameters goed te schatten.

In 2015 en 2016 hebben we 160 juveniele grutto's gezenderd met een satellietzender. 35-40% (afhankelijk van de einddatum) van deze individuen (55-64) hebben we de eerste zuidwaartse trek kunnen volgen. Dat is veel lager dan verwacht; we hadden verwacht na 2 jaar al genoeg individuen gevolgd te hebben voor deze analyse), maar de overleving van in het wild levende kuikens (dierproef 2) was vele malen lager dan verwacht. Het feit dat we nog zoveel juvenielen hebben kunnen volgen kwam door het succes met het opkweken in gevangenschap (zie dierproef 3) waardoor we toch voldoende kuikens met een zender op pad konden sturen.

We willen op zijn minst nog 25 individuen volgen in één jaar. Als we uitgaan van dezelfde overleving als in 2015 en 2016 (35-40%) moeten we nog 74 individuen zenderen wat goed overeenkomt met de 80 (totaal in dierproef 2 + 3) die we voornemens zijn.

¹ Green, S.B. (1991) How many subjects does it take to do a regression analysis? *Multivariate Behavioral Research*, **26**: 499-510.

B. De dieren

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

Grutto (*Limosa limosa limosa*); dieren worden verkregen door eieren van een in het wilde levende populatie grutto's (>1200 broedparen in ons onderzoeksgebied) te verzamelen en uit te broeden in Nederland (categorie B). Maximaal zullen er 72 eieren uitgebroed worden, hiervan zullen uiteindelijk 40 vogels voorzien worden van satellietzender. Alle 72 kuikens zullen tot het moment van uitvliegen voorzien worden van een radiozender en zullen gebloed worden. Grutto's vallen niet onder de door bijlage A van de Europese CITES verordening (EG) nr. 338/97, maar worden in dit geval speciaal gekweekt ter behoeve van een dierproef. Omdat wij zijn geïnteresseerd in het trekgedrag van de grutto kunnen we daarom geen andere soort kiezen.

Elke loslaatgroep bestaat uit 10 vliegvlugge kuikens, tezamen zijn dit 40 kuikens. Omdat wij in elke groep een genetisch verwant individu willen hebben (broer-zus) moeten van in totaal 10 nesten alle 4 de kuikens vliegvlug worden. Met een sterftepercentage van ongeveer 10% gedurende de periode tot vliegvlug worden betekend dit dat we in totaal 72 kuikens van 18 nesten nodig hebben om op de loslaatdatum nog 64 kuikens te hebben waarvan er 40 uit 10 nesten komen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: We zijn geïnteresseerd in de habitateisen en het trekgedrag van de grutto en kunnen daarom geen andere soort kiezen. Waarom wij grutto's bestuderen is uiteengezet in ons projectvoorstel. Zenders zijn noodzakelijk om data met de benodigde resolutie te krijgen. Met traditioneel kleuring-onderzoek kunnen we de overleving in bepaalde gebieden schatten, maar kunnen we niet aangeven waarom een kuiken doodgaat. Met de radiozenders kunnen we dat wel onderzoeken: waarom sommige kuikens overleven en anderen niet. Het nemen van een bloedmonster is er daarnaast noodzakelijk en onvervangbaar omdat de verwantschap en het geslacht van een individu anders niet met zekerheid vastgesteld kan worden. Kleurring-onderzoek kan ons ook helpen de trek van individuen te begrijpen, maar geeft ons slechts af en toe een datapunt en eigenlijk nooit uit Afrika; dit is lang niet gedetailleerd genoeg om de ontwikkeling van de trek te begrijpen. Ook kan je zonder zenders geen verschil maken tussen mortaliteit en dispersie, wat van groot belang is voor dit onderzoek. We kunnen dus niet anders dan grutto's en zenders gebruiken.

Vermindering: Voor overweging van de aantallen op te kweken en te zenderen juveniele vogels, zie de uitleg onder de kopjes 'Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken' van onderdeel A en "noem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes." van onderdeel B. Vermindering van de aantallen zal dus leiden tot ongewenste vermindering in statistische power. Voor de vermindering van het aantal te verzamelen eieren en dus het aantal kuikens dat in gevangenschap uitkomt verzamelen we alleen eieren die minder dan een week bebroed zijn. Uit ervaring hebben wij geleerd dat dit het uitkomstpercentage verhoogt en wij dus minder eieren behoeven te verzamelen, en dus minder vogels behoeven te huisvesten in gevangenschap. Doordat wij vogels uitrusten met satellietzenders is de resolutie van de data veel hoger en kunnen wij alleen al door dit feit voldoen met minder vogels dan wanneer we alleen gebonden zouden zijn aan ringwaarnemingen¹.

Verfijning: Het kan niet anders dan dat de vogels hinder ondervinden van de zender en het verblijf in gevangenschap maar wij gebruiken daarom de lichtst beschikbare zender van de hoogste kwaliteit en proberen het ongerief tijdens de periode in gevangenschap zoveel mogelijk te minimaliseren.

-Het afnemen van 10µl op zich is geen probleem voor de vogel; als vuistregel wordt bij dit type onderzoek aangehouden dat je bij bloedafname zonder probleem 1% van het lichaamsgewicht van de vogel kan afnemen.

- De satellietzenders op de kuikens zijn zo licht mogelijk. We zouden ook de goedkopere 9.5g zware zenders op kuikens kunnen gebruiken, maar we hebben ervoor gekozen te investeren in de lichtere 5g-zenders. Daarnaast rusten we de vogels een aantal dagen voor het loslaten uit met de zender, hierdoor kunnen de vogels alvast wennen aan de zender en wordt het effect van cumulatieve stress tijdens het loslaten verkleind.

- De radiozenders zijn zo licht mogelijk en zullen in tegenstelling tot wilde kuikens niet op het lichaam geplakt worden maar op een kleurring aan het loopbeen. Dit kan alleen in deze proef omdat onze zenders zonder antenne ook genoeg bereik hebben om ze in de enclosure met een oppervlakte van 2500m² terug te vinden. Dit zorgt ervoor dat we maar eenmaal een radiozender hoeven te plaatsen en het niet langer een impact heeft op het verenkleed en warmte-isolerend vermogen daarvan. Daarnaast kunnen we door de beperkte range waarin wij grutto-kuikens terug moeten vinden, gebruik maken van 0.65g zware radiozenders; deze zijn duurder maar verbeteren het comfort van de vogels.

- We hebben ondertussen veel ervaring met het zenderen van juveniele grutto's. We hebben een full-body harnas en leg-loop harnas uitgete probeerd. Mede door onze ervaringen in 2015&2016 weten wij nu dat een leg-loop harnas het comfort van een vogel minimaal aantast en dus vanuit een welzijns en wetenschappelijk perspectief de juiste keuze is.

- We verminderen de stress van de vogels tijdens het vangen en meten door dit alleen te laten doen door ervaren mensen en de vogels na het vangen in het veld gelijk in een donkere individuele ruimte te plaatsen. Dit heeft zeker een rustgevend effect op de vogel.

-Tijdens het vervoer van een 20-tal grutto's naar Polen zullen we 's nachts rijden (minimale kans op extra reistijd) en zoveel mogelijk stoppen om de vogels rust te geven tijdens het vervoer.

-Kuikens worden in Nederland gehuisvest dichtbij de [REDACTED]; hierdoor zal het ongerief tijdens het transport verminderen.

¹ Perdeck A.C. (1958) Two types of orientation in migrating starlings, *Sturnus vulgaris* L., and chaffinches, *Fringilla coelebs* L., as revealed by displacement experiments. *Ardea* 46:1-37

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

Voor het verzamelen, loslaten en vervoeren van kuikens hebben wij vergunningen op basis van artikel 75 en 114 van de Flora- en Faunawet. Daarnaast hebben wij een vergunning op basis van de Poolse Flora- en Faunawet die ons toestaat een 20-tal juveniele Grutto's los te laten in Polen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

De experimenten zoals beschreven in deze bijlage zijn reeds in 2015 en 2016 gedaan. Helaas heeft de hoge predatie van kuikens en juvenielen van wilde kuikens er toe geleid dat het niet mogelijk was om een vergelijking te maken tussen beide groepen. Naast de verhoogde predatie van wilde kuikens in 2015 hebben wij in dat jaar voor zowel wilde als gekweekte kuikens geconstateerd dat het toen gebruikte harnas (full-body) tot een verhoogde sterfte van kuikens leidde en wellicht het gedrag van de kuikens heeft beïnvloed (zie: D. Vervanging, vermindering en verfijning). Om de benodigde steekproefgrootte te halen is het dus noodzakelijk om het experiment eenmalig te dupliceren.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Er zijn geen standaard procedures voor het houden van grutto's; bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU geeft alleen eisen voor het verzorgen en huisvesten van Eenden/Ganzen/Kalkoenen/Kwartels. Op basis van kennis en ervaring¹ zullen de vogels gehuisvest worden zoals staat omschreven onder onderdeel 2A. Vergeleken met de huisvestingsnormen voor de beschreven soorten in de bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU vallen onze normen ruim binnen de marge zoals wordt voorgeschreven voor Eenden/Ganzen/Kalkoenen/Kwartels.

¹Teunissen, W.A. & Wymenga E. 2011. Factoren die van invloed zijn op de ontwikkeling van weidevogelpopulaties. SOVON onderzoeksrapport 2011/10.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

De dieren zullen gehuisvest worden [REDACTED].

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

Er is gekozen voor deze huisvesting, omdat we op deze manier het transport van de grutto-kuikens van en naar de enclosures in veld kunnen minimaliseren (+/- 5 minuten). Hiermee verminderen wij de stress voor de dieren tijdens het transport en zal het ongemak van de dieren verminderen (zie: D. Vervanging, vermindering en verfijning). Voor dit experiment zullen wij gebruik maken van een door ons zelf ontworpen en gebouwde ruimte waar wij kunnen garanderen dat deze vrij is van eventueel ongedierte en wij de vogels kunnen voorzien in hun behoeften tijdens het opgroeien. De benodigde warmte die de kuikens in de eerste 7 dagen nodig hebben zal voorzien worden door het plaatsen van een warmtelamp waar alle dieren gebruik van kunnen maken. Daarnaast kunnen de dieren door een uitgekiend dieet en ongelimiteerde hoeveelheid

water zich ontwikkelingen als soortgenoten in het vrije veld. Door de vogels elke dag te monitoren op zowel lichamelijke conditie als natuurlijk gedrag kunnen wij snel ingrijpen wanneer wij constateren dat een individu zich afwijkend ontwikkeld of gedraagt. Het feit dat er in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU geen omschrijving staat voor het huisvesten van grutto's maakt het moeilijk om de huisvesting te toetsen, maar wanneer wij de huisvesting vergelijken met soorten van vergelijkbare grote en gedrag voldoet onze huisvesting ruimschoots aan de huisvestingseisen.

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Wij verwachten alleen dat er alleen een vorm van pijn kan optreden bij de afname van bloed. Het injecteren van een verdoving zal cumulatief meer stress/ pijn opleveren dan de bloedafname alleen. Vanuit dit oogpunt is het dus niet wenselijk om de vogels te verdoven voor een bloedafname. Gedurende de rest van dit experiment is het niet de verwachting dat kuikens enige vorm van pijn ondervinden.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het is zonder meer duidelijk dat het vasthouden, vangen en meten van dieren tijdens de periode in gevangenschap tot stress leidt. Daarnaast veroorzaakt het vervoer van en naar de enclosures en naar Polen toe in zekere mate stress. Als laatste zou het welzijn van de losgelaten vogels met zender aangetast kunnen zijn doordat ze eventueel sneller uitgeput zijn en of opvallen door de zender.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress als gevolg van de handelingen en onwennigheid door het krijgen van een zender op de rug. Verder moet de zender worden megedragen wat meer energie kost en ook de snelheid van de vogel kan beïnvloeden. Verwacht wordt dat met name het opstijgen moeilijker is en de predator (zoals een slechtvalk) daar gebruik van kan maken. Daarnaast kan stress ontstaan doordat vogels voor een langere tijd in kleinere ruimte vervoerd worden en het hun onbekend is wat er gaat gebeuren.

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

Het vasthouden, vangen en meten van de dieren zal alleen gedaan worden door ervaren mensen; dit wordt alleen uitgevoerd in koppels van 2 zodat er altijd 1 persoon de volledige aandacht heeft voor de vogel en de andere persoon eventueel kan schrijven. Het vervoer van en naar de enclosures zal voor enige vorm van stress zorgen; de ervaring leert dat vogels hier snel gewend aan raken. Voor het vervoer van 20 gezenderde vogels naar Polen proberen wij het ongerief zoveel mogelijk te minimaliseren door deze reis in 1 keer te maken en onderweg om de 2 uur te stoppen voor een pauze van 30 minuten zodat vogels in alle rust kunnen eten en drinken. Daarnaast wordt de reis in de nacht uitgevoerd zodat we kunnen garanderen dat de temperatuur tijdens het vervoer niet onze voorgestelde maximale waarde overstijgt en we gezien de geringe verkeersactiviteit gedurende de nacht rustig door kunnen rijden. Tot zover hebben wij goede ervaringen met het transport van Nederland naar Polen en hebben wij nog niet te maken gehad met uitval van dieren wat gerelateerd kan worden aan het transport.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane

eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als een kuiken op dag x minder dan 10% van het minimale gewicht van een kuiken op dag x weegt, of het verenkleed onverzorgd is, of de cloaca opgezet is zal deze uit de experiment gehaald worden en in een aparte kooi verzorgd worden. Het minimale gewicht kan bepaald worden aan de hand van een groeicurve voor gruttokuikens¹. Gegevens worden bijgehouden in een individueel logboek. Mocht de vogel zich niet herstellen en meer dan 20% afwijken van het verwachte gewicht op dag x zullen wij de vogel termineren. Uitgevlogen verzwakte vogels worden indien mogelijk teruggevangen om verzorgd te worden, indien nodig zal de vogel getermineerd worden.

Dieren zullen getermineerd worden d.m.v. cervicale dislocatie, dit valt binnen de richtlijnen van bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU en levert vergeleken met de andere mogelijkheden tot terminatie de minste hoeveelheid stress op.

¹Beintema A.J. & Visser G.H. (1989) Growth parameters in chicks of charadriiform birds. ARDEA 77: 169 - 180

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

Op basis van ervaring uit de voorgaande 2 jaren verwachten wij dat ongeveer 10% van de kuikens uitvalt gedurende de eerste 15 dagen van hun leven. Na deze leeftijd hebben wij geen uitval meer gehad van kuikens in gevangenschap.

K. Classificatie van ongerief

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

Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

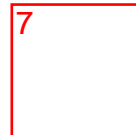
Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

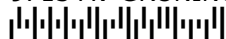


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD105002017823

Bijlagen

2

Datum 16 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 januari 2017. Het gaat om uw project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002017823. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

16 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017823

Datum:
16 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017823

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 01179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
16 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017823

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 1 maart 2022
Titel project: Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie
Titel niet-technische samenvatting: Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: Ant. Deusinglaan 1, huiscode [REDACTED] AV Groningen
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]
A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN
[POSTNET]

**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
AVD105002017823
Bijlagen
2

Datum 16 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 januari 2017
Vervaldatum: 15 februari 2017
Factuurnummer: 170823

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002017823	€ 1.541,00

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

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **9018**
 2. Titel van het project: **Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie**
 3. Titel van de NTS: **Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie**
 4. Type aanvraag:
 - 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: **07-12-2016**
 - aanvraag compleet: **07-12-2016**
 - in vergadering besproken: **15-12-2016**
 - anderszins behandeld: **27-12-2016, 03-01-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **19-12-2016 tot 23-12-2016, 28-12-2016 tot 02-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **23-12-2016**
 - advies aan CCD: **13-01-2017**
 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.
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **19-12-2016, 28-12-2016**

Gestelde vraag/vragen:

Vragen/opmerkingen t.a.v. het projectvoorstel:

1/ Achtergrond van het project helder beschreven met voldoende referenties. Wel mist de DEC een korte uiteenzetting van de relatie met het reeds lopende demografisch onderzoek aan de grutto: welke bijdrage levert dat onderzoek aan de nu geformuleerde onderzoeksvragen en waar / waarom schiet het tekort waardoor dit onderzoek nu nodig is?

2/ Doelen zijn helder geformuleerd. Er wordt gesproken over 'drie aanvullende methodes' om grutto's individueel te volgen wat suggereert dat er al een bestaande methode is; welke dat dan is blijft onbenoemd. Of wordt bedoeld 'elkaar aanvullende methodes'?

3/ De onderzoekstrategie is goed beschreven met voldoende detail. Een road map met daarin de verschillende onderzoeksstappen en eventuele go-no go momenten is echter gewenst.

Vervolg vragen

1/Het antwoord op vraag 1 vindt de DEC echter nog onvoldoende. Het gaat om het aangeven van wat het huidige demografische onderzoek heeft opgeleverd tot op heden en waarom de resultaten ervan niet voldoende zijn voor het beantwoorden van de vragen die in nu voorgestelde onderzoek centraal staan. M.a.w. waarom is dit onderzoek eigenlijk noodzakelijk als u –uw onderzoeksgroep- al zo lang naar de grutto heeft gekeken?

- Datum antwoord: **23-12-2016, 02-01-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

1/Antwoord: Aan het einde van paragraaf 3.1 van het projectvoorstel hebben we onderstaande tekst toegevoegd en mede door het opnemen van een roadmap denken we aan deze tekortkoming tegemoet te zijn gekomen. Het demografisch onderzoek is vooral bedoeld om de vinger aan de pols van de grutto-populatie te houden. Het heeft een beschrijvend karakter en is opgezet om de globale veranderingen in de belangrijkste populatieparameters te detecteren maar niet om ze te verklaren. Om te begrijpen waardoor die veranderingen veroorzaakt worden en hoe je ze bij kunt sturen, zal je moeten inzoomen op de achterliggende processen en soms gebruik moeten maken van experimenten. Vandaar dat we in dit onderzoek in het bijzonder focussen op voedsel, habitat en trekgedrag van kuikens want daarin zit de belangrijkste bottleneck voor het herstel van de gruttotopulatie in Nederland.

2/Antwoord: Jullie hebben helemaal gelijk: het moet zijn elkaar aanvullende methodes. Ik heb dat aangepast in de tekst bij 3.2. en 3.4.1.:3.2 Doel Om deze brede doelstelling te bereiken zullen wij drie elkaar aanvullende methodes gebruiken om grutto's individueel te kunnen volgen: kleurringen, opkweek en zenderen.

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

Om de doelstelling te bereiken zullen wij drie elkaar aanvullende methodes gebruiken om grutto's individueel te kunnen volgen: kleurringen, opkweek en zenderen.

3/Antwoord: onderstaande roadmap is toegevoegd aan het Projectvoorstel aan het einde van paragraaf 3.4.3 . Tussen de verschillende onderdelen zijn geen go-no go momenten aangegeven maar deze zijn wel omschreven in de 3 bijlagen.

Antwoord vervolgvraag

1/ Antwoord Ik denk dat uw vraag in eerste instantie niet goed begrepen heb omdat ik veronderstelde dat het u ging om de relatie tussen het demografisch onderzoek en het zender- en opfokexperiment; ik ga er van uit dat die relatie inmiddels voldoende duidelijk is. De reden dat we na 13 jaar nog steeds door willen gaan met het demografisch onderzoek is dat grutto's nog steeds afnemen (ongeveer 5% per jaar). Er zijn veel mensen in Nederland die dat erg vinden en willen weten of alle honderden miljoenen aan weidevogelbescherming bestede euro's wel goed terecht komen. Met onze demografische monitoring houden we een vinger aan de pols en meten we de belangrijkste parameters van de populatiedynamica EN krijgen we zicht op de sturende factoren daarachter. We spelen vervolgens een actieve rol om die inzichten om te zetten in beleid door overleg met overheden en beheerders en het beïnvloeden van de publieke opinie. Er is alle reden om daar mee door te gaan. Om twee voorbeelden te geven:

1. Het weidevogelbeleid is niet statisch. In de afgelopen 13 jaar is het overgegaan van de rijksoverheid naar de provincies en is de opzet drastisch gewijzigd. De laatste wijziging is precies een jaar geleden ingegaan (<http://www.portaalnatuurenlanschap.nl/themas/subsidiestelsel-natuur-en-landschapsbeheer/agrarisch-natuurbeheer/collectief-agrarisch-natuurbeheer-anlb-va-2016/>) en de verwachtingen zijn hooggespannen of deze koerswijziging het verschil gaat maken.

2. De factoren die de populatiedynamica van grutto's bepalen, zijn niet statisch. In 2014 werden grote delen van Noord-Nederland getroffen door een muizenplaag. Al dat alternatieve voedsel zorgde er aanvankelijk voor dat de predatiedruk op gruttotegelsels en -kuikens afnam. Maar de toegenomen predatoren deden zich in de jaren na de plaag bij gebrek aan muizen te goed aan weidevogels met dramatische gevolgen voor het broedsucces. Alleen met langjarige monitoring kan je trends onderscheiden van jaarlijkse fluctuaties.

Ik hoop dat ik hiermee voldoende aannemelijk heb kunnen maken dat het belangrijk is de demografische monitoring ook in komende vijf jaar vol te blijven houden.

- **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)? **Ja**
2. 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.
3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
5. 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. De verschillende subdoelen worden m.b.v. complementaire benaderingen aangepakt, dit om beantwoording van het hoofddoel mogelijk te maken. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten 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 Flora- en faunawet).

Niet tot de taken van de DEC behorend, overeenkomstig de WoD.

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 doelcategorieën 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 enerzijds het monitoren van de demografische parameters van een representatief deel van de Nederlandse gruttopopulatie, anderzijds het begrijpen van de processen die verantwoordelijk zijn voor veranderingen in deze parameters. Het uiteindelijke doel is om het voortbestaan van de soort te bevorderen en het verbeteren van het agrarisch natuurbeheer. Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel onderzoek en onderzoek ter bescherming van de soort. 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 project, wat gericht is op langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie, met name gericht op de analyse van de invloed van genetische en omgevingsfactoren op de overleving, zijn de proefdieren, en uiteindelijk ook de mens.

Waarden die voor de vogels 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 mens bevorderd kunnen worden: een beter (agrarisch) natuurbeheer en – voor de mens belangrijk – behoud van de biodiversiteit en natuurbehoud.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.
Niet tot de taken van de DEC behorend overeenkomstig de WoD.

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 alsmede de

aandacht voor de drie V's

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC 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*). **N.v.t.**

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

(*) het betreft hier veldonderzoek

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

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**

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

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 humane eindpunten in deze aanvraag goed gedefinieerd.

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 voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het betreft onderzoek naar dieren in hun natuurlijke omgeving waarvoor geen alternatieven bestaan

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.

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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 onderhavige projectaanvraag worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd.

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.

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

NTS

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

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie", dat zich richt op de analyse van genetische en omgevingsfactoren die van invloed zijn op de overleving van de grutto, het lichte-matige ongerief dat de vogels wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht – matig ongerief.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **naar de indruk van de DEC-RuG zal uitvoering van het onderhavige onderzoek op termijn tot voordeel strekken van de samenleving**

Algemeen: vergroting van onze kennis betreffende het terreingebruik van jonge en volwassen grutto's, de eisen die aan optimaal habitat worden gesteld, evenals van trekgedrag van jonge en volwassen grutto's en de bijdrage van trekomstandigheden aan de afname van grutto's in Nederland ten behoeve van de bescherming van de soort en effectief, duurzaam gebruik en beheer van het grasland waarin zij in Nederland voorkomen.

De DEC-RuG is van mening dat de wetenschappelijke belangen van de samenleving zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de vogels waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd in het project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie".

Daarenboven tellen ook de op termijn te behalen voordelen voor de samenleving mee.

De betrokken vogels zullen tijdens de experimenten licht tot matig ongerief en enige stress ondervinden. Zij worden door deze experimenten mogelijk in hun welzijn

geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door bloedafname. Na afloop van de experimenten worden zij vrijgelaten in hun natuurlijke biotoop.

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.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project leiden tot een relevante uitbreiding van onze kennis van de demografie van de grutto in Nederland en van de achterliggende factoren die met name de overleving van de grutto kuikens beïnvloeden. Een beter begrip van dergelijke mechanismen is van maatschappelijk en economisch belang.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht.

Het is zeer aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden.

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: *Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttipopulatie", - dat zich richt op de analyse van genetische en omgevingsfactoren die van invloed zijn op de overleving van de grutto - de opoffering en het lichte-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 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 hebben in voorgaand onderzoekprogramma's aangetoond te beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. 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 het voorgestelde project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttipopulatie" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

14 juli 2016

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

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
AVD105002017823
Bijlagen
1

Datum 27 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 13 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie" met aanvraagnummer AVD105002017823. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

Met het oog op artikel 10a, lid 1 van de wet, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de maximale vergunningsperiode 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

De CCD heeft geconstateerd dat u in het project onderzoek doet aan wilde dieren waarvoor volgens artikel 10f lid 1 van de wet een verbod geldt. Er is echter voldoende onderbouwing gegeven om het onderzoek op grond van artikel 10f lid 2 van de wet toch toe te staan. Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie

DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 januari 2016. 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.

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:
27 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017823

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



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 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "Langjarig onderzoek naar de demografie van de Nederlandse gruttopopulatie" met aanvraagnummer AVD105002017823, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 januari 2016, ontvangen op 13 januari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Bloedmonster				
	Andere vogels (andere Aves) / wilde gruttos	10.000	100% Licht	
2: Bloedmonster en zenderen				
	Andere vogels (andere Aves) / grutto's	113	82% Matig 18% Licht	
3: Opkweken, bloedmonster, translocatie, zenderen				
	Andere vogels (andere Aves) / Grutto's	72	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD105002017823

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 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:

AVD105002017823

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:
AVD105002017823

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.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Inventaris Wob-verzoek W17-07									
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document NTS2016824	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Machtiging				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11200 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Vrije Universiteit te Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>53815211</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>de Boelelaan</td><td>1105</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	53815211		Straat en huisnummer	de Boelelaan	1105			
Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	53815211																
Straat en huisnummer	de Boelelaan	1105															
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">-</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1081HV</td><td>Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr></table>	Postbus	-		Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam	IBAN	[REDACTED]		Tenaamstelling van het rekeningnummer	[REDACTED]				
Postbus	-																
Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam															
IBAN	[REDACTED]																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	[REDACTED]																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 3 - 2017
- Einddatum 1 - 3 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Mechanismen van neuropeptideafgifte en -transport
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-VU-VUMC
- Postadres [redacted] Amsterdam | The Netherlands
- E-mailadres [redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,- Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Amsterdam
Datum	16 - 01 - 2017
Handtekening	[REDACTED]



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Naast de snelle afgifte van neurotransmitters communiceren hersencellen met elkaar via de afgifte van met neuropeptiden gevulde blaasjes ('vesicles'). Neuropeptiden hebben een langdurig effect op de hersenen en oefenen hiermee een sterke invloed uit op processen als gedrag, gevoel en ontwikkeling. Er zijn meer dan 70 verschillende neuropeptiden bekend met een robuust effect op de functie van het brein: Ze reguleren voedselinname en slaapritme, sturen leer- en geheugenprocessen, en zijn essentieel voor een juiste ontwikkeling van de hersenen. Defecten in neuropeptide afgifte leiden tot neurologische en psychische aandoeningen als epilepsie, autisme, schizofrenie en depressie. Het neuropeptide oxytocine geeft deze sterke invloed goed weer. Dit neuropeptide is betrokken bij de onderdrukking van angst en controleert sociale 'bonding' (Knobloch et al., 2012). Oxytocine wordt daarom aangedragen als veelbelovende behandelingsmethode van stoornissen die zich kenmerken door abnormale sociale interactie, zoals schizofrenie (Millan et al., 2014), borderline persoonlijkheidsstoornissen, autisme (Meyer-Lindenberg et al., 2011), depressie (MacDonald et al., 2013) en angststoornissen (Guastella et al., 2009). Neuropeptide Y (NPY) laat een vergelijkbare geschiedenis zien: dit neuropeptide is een belangrijke potentiële kandidaat bij de behandeling van Post Traumatic Stress Disorder (PTSD, Sah et al 2013, Cohen et al. 2012). Deze voorbeelden laten het overduidelijke belang van neuropeptiden zoals oxytocine en NPY voor ons gedrag zien. Maar ondanks de fundamentele zijn de mechanismen die de afgifte van deze stoffen in het brein controleren vrijwel onbekend en is het effect van neuropeptiden afgifte op de doelcellen niet goed uitgezocht.

Het gebrek aan inzicht in de mechanismen van neuropeptidenafgifte en het effect van neuropeptiden op de doelcellen is een groot probleem bij de ontwikkeling van nieuwe en betere behandelingsmethoden voor de vele hersenaandoeningen waarbij neuropeptiden een rol spelen. Het is daarom van essentieel belang om de onderliggende moleculaire processen tot in detail te begrijpen. Alleen dan kunnen we tot betere therapieën komen die de ziekteprocessen kunnen stoppen. Gezien de aard van de aandoeningen waaraan het disfunctioneren van het neuropeptide systeem ten grondslag ligt en het grote aantal mensen die deze aandoeningen heeft achten wij het verantwoord om deze aandoeningen in dieren te onderzoeken.

[REDACTED]. Tevens maken de neuronen in celculturen geen contact met de correcte doelcellen. Daardoor kunnen de effecten van neuropeptideafgifte op doelcellen niet worden onderzocht in celculturen Het is daarom van essentieel belang dat naast de cellulaire studies de mechanismen van neuropeptideafgifte en het effect van deze afgifte op doelcellen in het intacte brein en in specifieke hersengebieden wordt onderzocht. Alleen in het intacte brein en in hersenplakjes is de natuurlijke omgeving intact en projecteren neuronen naar de juiste doelcellen zodat de correlatie tussen afgifte van neuropeptiden en effecten op de doelcellen kan worden bestudeert en getest kan worden of de afgifte principes [REDACTED]

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Ondanks het overduidelijke belang van neuropeptiden voor hersenfunctie is er helaas op dit moment weinig tot geen kennis over de mechanismen waarmee de met neuropeptiden gevulde blaasjes worden getransporteerd en afgegeven in het brein. Daarnaast is het effect van neuropeptide afgifte op de exciteerbaarheid van de doelcellen voor de meeste neuropeptiden onbekend. Het hoofddoel van deze studie daarom is om de mechanismen

van neuropeptideafgifte te leren begrijpen, en richt zich hiervoor op de *moleculaire* mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en de *effecten* van neuropeptideafgifte op lokale netwerkactiviteit.

Aan de hand van deze onderwerpen zijn de volgende onderzoeksvragen opgesteld:

(1) Wat zijn de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte in het brein?

In de hersencellen worden neuropeptiden getransporteerd in lipide-blaasjes die met de celmembraan kunnen fuseren en zo hun inhoud loslaten om signalen af te geven naar andere cellen. Voor een effectieve werking van neuropeptiden is het essentieel dat de fusie van neuropeptideblaasjes met de celmembraan sterk wordt gereguleerd en dat de blaasjes in de buurt van synapsen fuseren om zo de afgifte van neurotransmitters efficiënt te kunnen beïnvloeden. [REDACTED]

[REDACTED] Echter, dit *in vitro* systeem heeft belangrijke beperkingen: zo maken de neuronen synapsen op willekeurige omliggende neuronen en zijn de calcium niveaus (veel) hoger dan in het intacte brein. Welke eiwitten essentieel zijn voor de afgifte van neuropeptideblaasjes in de buurt van synapsen in het intacte brein en welke eiwitten belangrijk zijn bij de calciumafhankelijke afgifte is daarom volledig onbekend. [REDACTED]

[REDACTED] Het doel is om tot een volledige beschrijving te komen van het fusie mechanisme van neuropeptiden in het brein. Omdat neuropeptiden een sterk effect hebben op zowel hersenontwikkeling als hersenfunctie in volwassen organismen, onderzoeken we of de mechanismen van afgifte tijdens de ontwikkeling en in volwassen dieren overeenkomen.

(2) Wat is de relatie tussen neuropeptideafgifte en de communicatie van hersennetwerken: het neuropeptide oxytocine als modelsysteem

Neuropeptiden reguleren de activiteit van hersencellen. Het is helaas niet bekend hoe neuropeptiden worden afgegeven en hoeveel met neuropeptiden gevulde blaasjes nodig zijn om een effect te hebben op de doelcellen. [REDACTED]

[REDACTED] We gebruiken voor deze studies het neuropeptide oxytocine als model systeem, omdat het oxytocine systeem goed beschreven is door onze collega's (Knobloch et al., 2012), oxytocine een sterk effect heeft op hersenactiviteit en geassocieerd is met hersenaandoeningen waaronder het Prader Willi syndroom (PWS). PWS is een genetisch defect waarbij patiënten, naast eetstoornissen, cognitieve en sociale problemen hebben. Het neuropeptide oxytocine speelt een belangrijke rol in dit syndroom. PWS patiënten hebben verlaagde oxytocineniveaus in het brein, waarschijnlijk door een probleem bij de synthese en afgifte van dit neuropeptide. Toediening van oxytocine aan PWS patiënten laat een sterke verbetering zien van de symptomen en lijkt daarmee een veelbelovende vorm van therapie. We begrijpen alleen het mechanisme van dit effect nog niet. We testen de hypothese dat oxytocine de connecties van oxytocine axonen met hun doelgebieden herstelt en/of de afgifte van oxytocineblaasjes bevordert. Dit onderzoeken we door fluorescent gelabeld oxytocine samen met een axonmarker tot expressie te brengen in muizen en ratten, en vervolgens deze processen te bestuderen in het intacte brein en in hersenplakjes. Omdat oxytocine een belangrijke rol speelt tijdens zowel de ontwikkeling van de hersenen als in het volwassen brein, testen we de effecten van oxytocineafgifte in hersenplakken van jonge pasgeboren dieren en volwassen dieren. Samen met de kennis opgedaan in onderzoeksvraag 1 kunnen we gerichte therapieën voorstellen om oxytocine signaaloverdracht te verbeteren in PWS patiënten. Defecten in oxytocine signalering liggen ook ten grondslag aan post-traumatische stress (PTSD) en autisme spectrum disorders (ASD). De door ons verkregen inzichten in de moleculaire mechanismen die hieraan ten grondslag liggen vormen de basis voor meer gerichte aanpak van deze aandoeningen.

Haalbaarheid:

Het doel is om de bovenstaande onderzoeksvragen over een periode van 5 jaar te beantwoorden. Deze schatting is gebaseerd op onze jarenlange ervaring met het verloop en de duur van vergelijkbare onderzoeksprojecten. De expertise, technische ondersteuning, funding en mankracht om dit project binnen deze tijd te kunnen afronden is aanwezig bij de vakgroep (40 FTE research staff, 10 FTE

ondersteunend personeel).

3.3 Belang

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

Maatschappelijk belang. Dit project is belangrijk omdat neuropeptiden betrokken zijn bij neurologische en psychiatrische processen met enorme maatschappelijke impact, zoals angst- en stemmingsstoornissen, autisme, overgewicht, epilepsie en pijnervaring. Tot op heden is de behandeling van deze aandoeningen vaak enkel symptomatisch om tot een meer succesvolle interventie te komen is fundamenteel inzicht in neuropeptide afgifte en het effect van deze afgifte noodzakelijk.

In een recent review in het toonaangevende blad Science (Young et al. 2015) wordt gesteld dat het gebrek aan mechanistisch inzicht in de afgifte van het neuropeptide oxytocine een succesvolle therapie in de weg staat. Hoewel toediening van oxytocine wordt aangedragen als veelbelovende behandelingsmethode van stoornissen die zich kenmerken door een abnormale sociale interactie, zoals schizofrenie (Millan et al. 2014), borderline persoonlijkheidsstoornissen, autisme (Meyer-Lindenberg et al. 2011), depressie (MacDonald et al. 2013, Mah et al. 2013) en angststoornissen (Guastella et al. 2009) en dus in potentie een enorme impact kan hebben op het welzijn van miljoenen mensen. Staat het gebrek aan kennis van de onderliggende mechanismen verdere ontwikkeling van therapieën in de weg. Ons onderzoek kan hierdoor bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de hierboven genoemde aandoeningen en zo ernstig ongerief bij mensen helpen verminderen.

De lijst met voorbeelden van neuropeptiden gerelateerd aan neurologische aandoeningen is lang. Neuropeptide Y (NPY) is een belangrijke potentiële kandidaat bij de behandeling van Post Traumatic Stress Disorder (PTSD, Sah et al 2013, Nulk et al. 2011). Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is een belangrijke regulator van neurotransmissie en connectiviteit. Dit neuropeptide staat sterk in de belangstelling als mogelijke behandeling voor neurodegeneratieve aandoeningen zoals Alzheimer 's, Parkinsonisme en Huntington (Nagahara and Tuszynski, 2011).

Dus, omdat onze onderzoeksmethoden het gedrag bestuderen van alle neuropeptide vesicles beperkt het belang zich niet tot het neuropeptide oxytocine dat wij als model systeem gebruiken maar bestrijkt het het hele veld van aan neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen.

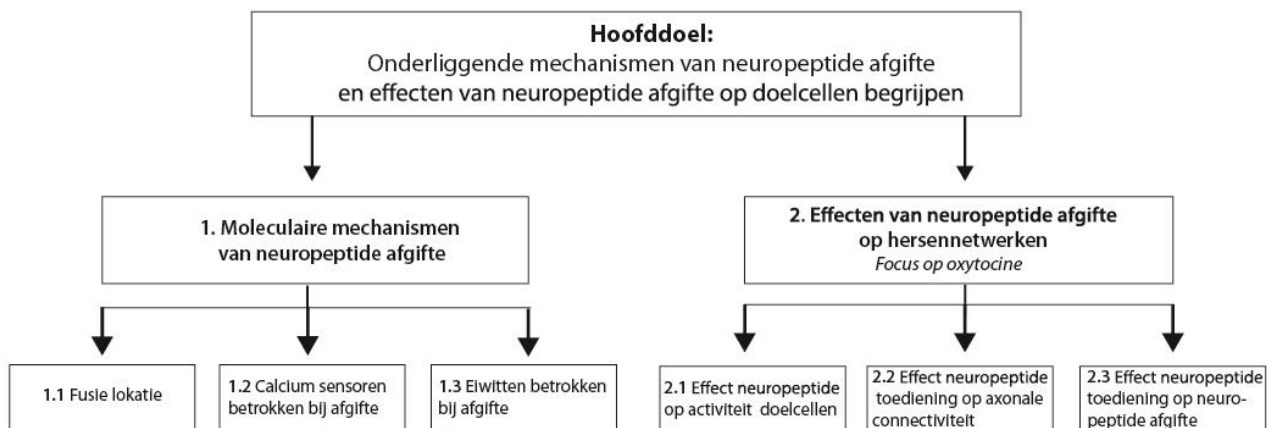
Wetenschappelijk belang. De gereguleerde afgifte van signaal moleculen is essentieel voor het functioneren van ons brein. In tegenstelling tot de uitgebreid beschreven mechanismen die de fusie van met neurotransmitter geladen blaasjes reguleren (Nobel prijs 2012) weten we nog weinig van de fusie mechanismen van neuropeptideblaasjes. Deze studie zal wetenschappelijk inzicht verschaffen in de mechanismen van neuropeptideafgifte. Ons doel is om tot hetzelfde hoge niveau van begrip te komen als verkregen is voor synaptische blaasjes. Daarnaast zal deze studie de wetenschappelijke kennis over de effecten van de afgifte van neuropeptiden op hersenactiviteit vergroten. Hiermee zal dit onderzoek fundamentele kennis leveren die nodig is voor het begrijpen van de afgifte en regulatie van de afgifte van neuropeptiden, zoals NPY en oxytocine en leiden tot belangrijke wetenschappelijke voortgang in onderzoek naar de onderliggende mechanismen van neuropeptide-dysfunctie in hersenaandoeningen.

[Redacted text]

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het hoofddoel van deze studie is om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en de effecten van neuropeptideafgifte op lokale netwerkactiviteit te begrijpen. De twee onderzoeksvragen worden opgedeeld in drie subvragen. De proefopzet van dit project is weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. Algemene opzet van het project.

(1) Wat zijn de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte in het brein?

Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden zullen neuropeptideblaasjes worden gelabeld met fluorescente neuropeptiden (zie 3.4.2) en zullen de volgende subvragen worden beantwoord:

1.1 Wat is de subcellulaire locatie van neuropeptideafgifte in intacte hersengebieden?

[Redacted text] Hier testen we of dit in intacte embryonale en volwassen hersengebieden ook zo is en of dezelfde principes gelden voor verschillende neuropeptiden.

1.2 Welke calciumsensoren zijn betrokken bij afgifte van neuropeptiden in intacte hersengebieden?

[Redacted text] Hier testen we deze hypothese.

1.3 Wat is de rol van zogenaamde priming-eiwitten zoals [Redacted text]

[Redacted text] Hier testen we of in intacte hersengebieden deletie van deze eiwitten een effect heeft op de afgifte van neuropeptiden.

Model: hersenplakjes waarbij neuropeptiden en synapsen gelabeld zijn door middel van *in utero* elektroporatie (IUE) van muizenembryo's voor analyse in embryonale hersenen, en virale injecties van jong volwassen muizen voor analyse in volwassen hersenen. Stimulatie door middel van elektrische veldstimulatie en/of optogenetica. Subvraag 1.1 zal uiteindelijk ook getest worden *in vivo*.

Uitleesparameter: fusie van individuele neuropeptideblaasjes na stimulatie. Analyse synaptische en extrasynaptische afgifte via live labeling van synapsen.

(2) Wat zijn de effecten van neuropeptideafgifte op de communicatie van hersennetwerken het neuropeptide oxytocine als modelsysteem

Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden zullen, in de hersenen van ratten, oxytocineblaasjes worden gelabeld met fluorescent oxytocine (zie 3.4.2). Ratten worden voor oxytocine-experimenten ingezet vanwege hun grote aantal oxytonerge neuronen. Hiermee zullen de volgende subvragen worden beantwoord:

2.1 wat is de correlatie tussen oxytocineafgifte en modulatie van de doelneuronen?

Hier testen we in hersenplakjes de correlatie tussen afgifte van fluorescent gelabelde oxytocineblaasjes en activiteit van de doelcellen door middel van elektrische stimulatie van afgifte en elektrofysiologische metingen aan de doelcellen.

2.2 wat is het effect van oxytocinetoediening op de axonale connectiviteit van oxytocine-neuronen?

Oxytocine zal worden toegediend aan hersenplakjes en de axonale connectiviteit zal worden bestudeerd met microscopische technieken. Voor *in vivo* metingen van axonale connectiviteit zal fluorescent oxytocine samen met een axonale marker tot expressie worden gebracht in volwassen muizen

2.3 wat is het effect van oxytocinetoediening op het transport en afgifte van oxytocineblaasjes?

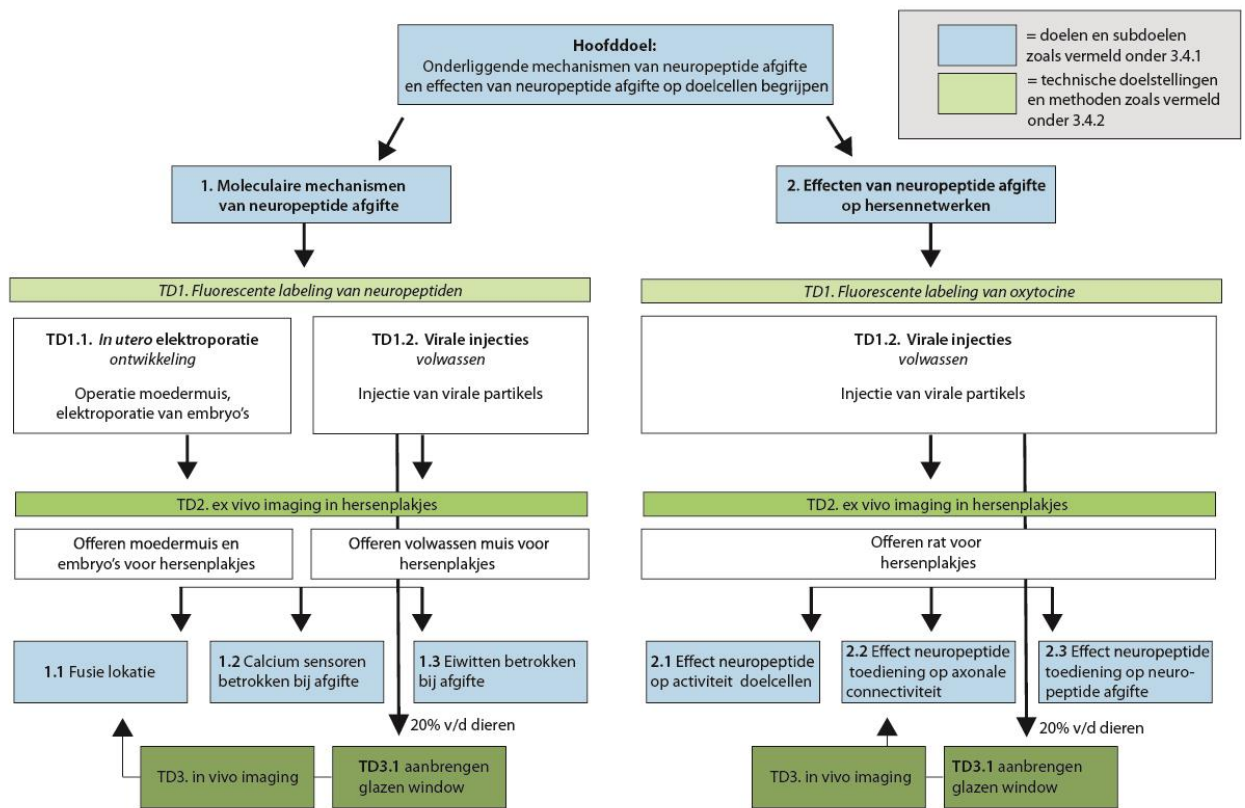
Oxytocine zal worden toegediend aan hersenplakjes van ratten en het transport en de afgifte zal worden bestudeerd met microscopische technieken. Netwerkactiviteit en het effect van oxytocine zal worden gemeten met behulp van elektrofysiologische metingen.

Model: hersenplakjes waarbij het neuropeptide oxytocine en synapsen gelabeld zijn door middel van virale injecties van jong volwassen ratten voor analyse in volwassen hersenplakjes. Stimulatie door middel van elektrische veldstimulatie en/of optogenetica.

Uitleesparameter: fusie van individuele neuropeptideblaasjes na stimulatie. Analyse effect op doelcellen door middel van elektrofysiologie.

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

In de komende alinea's zal worden beschreven welke dierproef ingezet zal worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen (3.4.1). Om de onderzoeksvragen te beantwoorden, zullen neuropeptiden fluorescent gelabeld moeten worden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van: (1) *In utero* elektroporatie (IUE), of (2) virale injecties (zie *figuur 2*).



Figuur 2. Dit figuur geeft de logische samenhang weer van de methoden (technische doelen, TD, groene onderdelen) die uitgevoerd zullen worden om de hiervoor beschreven doelen en subdoelen te bereiken (blauwe onderdelen), zoals vermeld bij onderdeel 3.4.1.

Rationale:

- IUE zal alleen in muizen toegepast worden, en vanwege het gebruik van ratten voor onderzoeksvraag twee, alleen voor onderzoeksvraag 1 worden gebruikt.
- IUE kan niet worden gecombineerd met het plaatsen van een glazen window, vandaar dat alleen virale injecties kunnen worden opgevolgd door een *in-vivo* imaging studie.
- De leeftijden van de dieren dit in deze studie worden ingezet, variëren van prenataal (IUE) en ouder dan 2 weken (virale injecties). Dit heeft te maken met de leeftijd waarop dieren geïnjecteerd kunnen worden voor beide methoden.

TD, Technisch doel

Voor beide onderzoeksvragen zijn twee technische doelen (TD) van belang:

TD 1. Labeling van neuropeptideblaasjes door middel van de expressie van fluorescente neuropeptiden

Om de hierboven beschreven mechanismen en effecten van neuropeptideafgifte te bestuderen, worden neuropeptideblaasjes in muizen en ratten zichtbaar gemaakt door fluorescent gelabelde neuropeptiden tot expressie te brengen. [redacted]. We gebruiken twee complementaire strategieën: (1) *in utero* elektroporatie (IUE, Appendix 1) en (2) virale injecties in de hersenen (Appendix 2).

TD 1.1 In utero elektroporatie (IUE) van muizen voor imaging in hersenplakjes

IUE is essentieel om de effecten van neuropeptideafgifte te bestuderen tijdens de ontwikkeling van de hersenen (zie Appendix 1). [redacted]

Tijdens de zwangerschap zal de moedermuis een operatie ondergaan onder anesthesie en adequate pijnstilling, waarbij de uterus uit het abdomen wordt gehaald en de foetussen geëlektroporeerd worden met DNA constructen om neuropeptideblaasjes (NPY, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) of oxytocine), synaptische contacten (synapsin) en axonale projecties fluorescent te labelen. De moedermuis zal peri-operative pijnstillers ontvangen. De foetussen zullen uit de moeder worden gehaald voor de geboorte, waarbij de moedermuis zal worden geofferd door middel van cervicale dislocatie. De hersenen van de *in utero* geëlektroporeerde dieren zullen worden gebruikt voor de bereiding van hersenplakken (zie TD2 hieronder).

TD 1.2 Virale injectie in volwassen muizen en ratten voor imaging in hersenplakjes en in vivo imaging

Virale injecties worden gebruikt om neuropeptideblaasjes te labelen in specifieke hersenregio's van volwassen muizen en ratten. Virale injecties worden toegepast op jong volwassen dieren vanwege de beschikbare Bregma coördinaten (zie Appendix 2). Het injecteren bestaat uit een operatie onder volledige narcose waarbij de vacht wordt weggeschoren en de schedel via een incisie wordt blootgelegd. De locatie van injectie kan nauwkeuring bepaald worden aan de hand van Bregma coördinaten. Uit experimenten van onze collega Prof. Dr. Valery Grinevich in Heidelberg is gebleken dat virale expressie van oxytocine binnen 2 weken na injectie zichtbaar is (Knobloch et al., 2011). De hersenen van de geïnjecteerde muizen en/of ratten zullen worden gebruikt om neuropeptideafgifte in hersenplakken van volwassen dieren te bestuderen.

TD 2. Ex vivo imaging methoden

TD 2.1 Hersenplakjes voor ex vivo live cell imaging

Voor het bereiden van hersenplakjes zal het dier geofferd worden, waarna de hersenen worden verwijderd voor analyse. Voor studies naar het mechanisme van neuropeptideafgifte en het effect van oxytocine in embryonale hersenen zal de zwangere moedermuis geofferd worden door middel van cervicale dislocatie en de pups geofferd worden door decapitatie, waarna hersenplakken bereid worden. Voor studies in hersenplakjes van viraal geïnjecteerde dieren zullen volwassen muizen en ratten geofferd worden door middel van cervicale dislocatie. Na afloop van het imaging experiment worden de hersenplakjes gefixeerd voor immunohistochemische analyse.

TD 3. In vivo imaging methode

TD 3.1 Aanbrengen van glazen 'window' voor in vivo imaging

Voor *in vivo* imaging zal gebruikt worden gemaakt van levende dieren, waarbij de virale injecties (TD1.2) worden gecombineerd met het plaatsen van een glazen 'window', om met two-photon microscopie neuropeptideblaasjes te volgen in de cortex van het (volledig verdoofde) dier. Dit maakt het mogelijk om projecties van met fluorescente neuropeptiden geïnfecteerde hersengebieden naar de cortex te bestuderen.

Type dierproeven specifiek voor het neuropeptide oxytocine:

TD 4. Indien nodig: verhogen van oxytocine expressie na virale injectie (TD1.2)

Pilot experimenten zullen uitgevoerd worden in viraal geïnjecteerde dieren om de expressieniveaus van oxytocine te bepalen. Hiervoor zullen ratten worden gebruikt, omdat deze dieren oxytocine hoger tot expressie brengen dan muizen, waardoor de detectiekans sterk wordt verhoogd. Mocht dit niet voldoende zijn, dan zal 'salt loading' toegepast worden om de expressie van oxytocine te verhogen volgens beproefde protocollen (Fields (2012), Ho (1995), Lepetit et al. (1991)). Deze methode is specifiek voor oxytocine en zal niet worden toegepast bij bestudering van andere neuropeptiden. De expressieniveaus verhogen sterk wanneer dieren licht gedehydrateerd raken. Om dieren wel toegang te geven tot drinkwater, kan er zout aan het drinkwater worden toegevoegd 7 dagen voordat het experiment van start gaat (Fields (2012), Ho (1995), Lepetit et al. (1991)). Dit verhoogt de expressie van het neuropeptide oxytocine in de hersenen.

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

De experimenten beschreven in deze studie zijn sterk complementair en zullen zo veel mogelijk parallel worden uitgevoerd (zie figuur 4). Alle benodigde apparatuur, virale partikels, muizenlijnen en mankracht zijn aanwezig om dit

nucleus accumbens oxytocin and serotonin. Nature. 501:179-184.

- Guastella AJ, Howard AL, Dadds MR, Mitchell P, Carson DS. 2009. A randomized controlled trial of intranasal oxytocin as an adjunct to exposure therapy for social anxiety disorder. Psychoneuroendocrinology. 34(6):917-23.
- Knobloch, H.S., A. Charlet, L.C. Hoffmann, M. Eliava, S. Khrulev, A.H. Cetin, P. Osten, M.K. Schwarz, P.H. Seeburg, R. Stoop, and V. Grinevich. 2012. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. Neuron. 73:553-566.
- Macdonald K, Feifel D. 2013. Helping oxytocin deliver: considerations in the development of oxytocin-based therapeutics for brain disorders. Front Neurosci. 7:35.
- Meyer-Lindenberg A1, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. 2011. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. Nat Rev Neurosci. 12(9):524-38.
- Meziane, H., F. Schaller, S. Bauer, C. Villard, V. Matarazzo, F. Riet, G. Guillon, D. Lafitte, M.G. Desarmenien, M. Tauber, and F. Muscatelli. 2015. An Early Postnatal Oxytocin Treatment Prevents Social and Learning Deficits in Adult Mice Deficient for Magel2, a Gene Involved in Prader-Willi Syndrome and Autism. Biological psychiatry. 78:85-94.
- Millan MJ, Fone K, Steckler T, Horan WP. 2014. Negative symptoms of schizophrenia: clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. Eur Neuropsychopharmacol. 24(5):645-92.
- Nagahara & Tuszynski. 2011. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nature Reviews Drug Discovery 10, 209-219.
- Sah R, Geraciotti TD. 2013. Neuropeptide Y and posttraumatic stress disorder. Mol Psychiatry. 18(6):646-55.
- Schaaf, C.P., M.L. Gonzalez-Garay, F. Xia, L. Potocki, K.W. Gripp, B. Zhang, B.A. Peters, M.A. McElwain, R. Drmanac, A.L. Beaudet, C.T. Caskey, and Y. Yang. 2013. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. Nature genetics. 45:1405-1408.
- Schaller, F., F. Watrin, R. Sturny, A. Massacrier, P. Szepetowski, and F. Muscatelli. 2010. A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted Magel2 gene. Human molecular genetics. 19:4895-4905.
- Tauber, M., C. Mantoulan, P. Copet, J. Jauregui, G. Demeer, G. Diene, B. Roge, V. Laurier, V. Ehlinger, C. Arnaud, C. Molinas, and D. Thuilleaux. 2011. Oxytocin may be useful to increase trust in others and decrease disruptive behaviours in patients with Prader-Willi syndrome: a randomised placebo-controlled trial in 24 patients. Orphanet journal of rare diseases. 6:47.
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Young, L.J., and C.E. Barrett. 2015. Neuroscience. Can oxytocin treat autism? Science. 347:825-826.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	<i>In utero</i> elektroporatie en <i>ex vivo</i> imaging
2	Virale injecties en <i>ex vivo</i> en <i>in vivo</i> imaging
3	
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit van Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	In Utero Elektroporatie

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het hoofddoel van deze studie is om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en de effecten van neuropeptideafgifte op lokale netwerkactiviteit te begrijpen. Om tot dit doel te komen is het nodig om neuropeptide vesicles in hersencellen fluorescent te labelen door middel van *in utero* elektroporatie (IUE). IUE is een standaard methode waarbij embryo's een DNA injectie in het brein ontvangen, en het DNA via een elektrische lading in de hersencel wordt gebracht (voor review artikelen, zie Nishimura et al. 2012 and Taniguchi et al. 2012). IUE heeft als voordeel dat we in jonge dieren expressie kunnen waarnemen en meerdere embryo's per operatie kunnen gebruiken. De moedermuis met embryo's worden in de laatste week van de zwangerschap geofferd, waarna neuropeptide transport en afgifte mechanismen worden bestudeerd in hersenplakjes met behulp van fluorescentiemicroscopie. Primaire uitkomstparameters zijn: neuropeptide vesicle-dynamiek (snelheid en richting parameters), aantal vesicle fusie-events na stimulatie (door middel van elektrische stimulatie of via optogenese), en locatie van fusie-events. Deze kwantitatieve parameters worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wild-type nestgenoten.

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

Deze procedure zal bestaan uit de volgende stappen:

1. Applicatie van DNA constructen in breinen van ongeboren foetussen.

Door middel van IUE zullen DNA constructen in het brein van ongeboren foetussen (E7-E16) ingebracht

worden. Onder anesthesie wordt de uterus van zwangere moederdieren blootgelegd en embryo's geïnjecteerd met DNA constructen in het brein gevolgd door stimulatie met externe elektroden om het DNA in specifieke brein gebieden (hippocampus) tot expressie te brengen. Peri-operatieve pijnstilling zal aan het moederdier worden gegeven.

2. De geïnjecteerde dieren zullen geofferd worden door middel van cervicale dislocatie op 2 verschillende tijdstippen na het inbrengen van de DNA constructen: om effecten van neuropeptiden te bestuderen tijdens hersenaanleg zullen zwangere moederdieren worden geofferd op E18 door middel van cervicale dislocatie waarna embryo's uit de uterus gehaald en gedecapiteerd. Breintjes worden gedissecteed en hersenplakjes gebruikt voor microscopische analyses. Cervicale dislocatie en decapitatie worden zonder verdoving uitgevoerd, omdat anesthetica inwerken op de hersenen en invloed hebben op eiwitcomplexen en synaptische netwerken, waardoor ze tot een verstoord beeld leiden en interfereren met dit onderzoek.

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

Kwalitatieve analyse:

Het aantal dieren is gebaseerd op jarenlange ervaring van ons en van collega-onderzoekers. IUE is een zeer reproduceerbare methode om DNA tot expressie te brengen in specifieke hersengebieden en de DNA constructen zijn door ons uitvoerig getest *in vitro* en *in vivo*. Wij schatten de uitval van dieren door te lage expressie van de constructen en/of mistargeting van de doelgebieden op 10% van de geïnjecteerde embryo's. Mocht de succesrate tijdens het project nog verder verbeteren, dan zal de groepsgrootte worden verlaagd.

Kwantitatieve analyse:

Neuropeptide dynamiek en fusie zal worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wildtype littermates. Power analyses zullen worden gebruikt om de groepsgrootte te bepalen. Groepsgrootte calculaties zijn uitgevoerd met de volgende parameters: p-value van 0.05 en een power van 80%. Deze waarden worden standaard toegepast in wetenschappelijk onderzoek en zijn internationaal geaccepteerde normen voor een statistisch betrouwbare proef. Op basis van onze resultaten uit *in vitro* onderzoek verwachten wij een effect size van tenminste 20%. Samen met een verlies van 10% van de dieren, zoals uitgelegd in de vorige alinea, resulteert dit een maximum van $14 + 10\% = 16$ moederdieren per experiment.

Deze aantallen zijn als volgt berekend:

Voor de *in utero* elektroporatie zal uitgegaan worden van effect size van 20% , $\alpha=0.05$ en een power van 0.80. Met een poweranalyse kan dan de groepsgrootte worden bepaald voor een goede statistische analyse: voor een Wilcoxon-Mann-Whitney test zijn dan 325 metingen per experiment per groep nodig. Per embryo kunnen gemiddeld 2 hersenplakken van de regio van interesse worden gemaakt. Per hersenplak kunnen 4 metingen worden uitgevoerd. Per embryo kunnen daarom gemiddeld 8 metingen worden uitgevoerd. Voor de Mann-Whitney zijn daarom $(325/8=)$ 41 embryo's nodig per experimentele groep. Bij IUE worden gemiddeld 6 embryo's per moeder geïnjecteerd, gelijk aan 48 metingen per IUE. Om een goede statistische analyse te kunnen uitvoeren, zijn daarom 7 moeders per groep nodig. Een typisch experiment bestaat uit een experimentele groep (een knock-out dier) en een controlegroep (wild-type littermates). De controlegroep is essentieel om een vergelijking te kunnen maken tussen de mutant dieren en de wild-type situatie. Voor beide groepen accepteren we een gelijke foutmarge (0.05) en power (0.8) voor een statistisch betrouwbare proef, waardoor de groepsgrootte voor beide groepen gelijk is. Daarom zijn 14 moederdieren nodig hebben om één

experiment uit te voeren. Tijdens dit onderzoek zal rekening gehouden worden met een verlies van 10%, door uitval van embryo's als gevolg van de elektroporatie, mistargeting van het DNA construct en lage elektrofysiologische activiteit van de hersencellen na de bereiding van hersenplakken, waardoor er op 16 moederdieren per experiment wordt gerekend.

Voor de beantwoording van de eerste drie onderzoeksvragen (projectvoorstel 3.4.1, figuur 1, subdoel 1.1-1.3) zullen 7 genotypen worden getest. Dit staat gelijk aan (7 genotypen x 3 onderzoeksvragen =) 21 experimenten. Voor het bereiken van de drie subdoelen zijn daarom 336 moedermuizen nodig, overeenkomend met 2.016 embryo's, waarvan de helft tot de controlegroep behoort (wildtype) en de andere helft tot de experimentele groep behoort (mutant muizen).

16 moederdieren, gelijk aan 96 embryo's, zijn ingecalculeerd voor de karakterisatie van de DNA constructen en het bepalen van de expressieprofielen.

Muizen	Moedermuizen	Embryo's
Karakterisatie DNA constructen	16	96
Experimentele groep	168	1008
Controle groep (Wild-type littermates)	168	1008
Totaal	352	2112

B. De dieren

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

Diersoorten en herkomst: Voor dit experiment worden muizen aangekocht bij een erkende fokker of in-huis gefokt.

Geslacht: Omdat gebruik wordt gemaakt van zwangere dieren, zullen alleen vrouwtjesdieren worden geopereerd.

Levensstadia: vrouwtjes vanaf 8 weken oud zullen gebruikt worden voor de fok. Embryo's van E7-E16, van beide geslachten, zullen gebruikt worden voor de elektroporatie en voor de bevalling worden gedecapiteerd.

Geschatte aantallen: voor dit onderzoek zijn 352 moedermuizen en 2112 pups benodigd over een periode van vijf jaar.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging. Voor deze proeven is geen *in silico* vervanging mogelijk. Voor studies naar biologische processen in het brein zijn muizen en ratten de beste modellen vanwege de mogelijkheid van genetische modificatie (knock-outs).

Vermindering. Door statistisch onderbouwde groepsgrootte en onze eerder opgebouwde ervaring kunnen we het aantal benodigde dieren zo klein mogelijk houden. De procedures beschreven in de project zijn gebaseerd op wetenschappelijke en experimentele ervaring in muizen. Alle chirurgische handelingen en imaging technieken zijn volledige geoptimaliseerd. Power calculaties voor groepsgroottes met realistische parameters zorgen dat het minimaal aantal dieren gebruikt zal worden en toch waardevolle data verkregen zal worden. Wij proberen zo optimaal mogelijk te werken door zoveel mogelijk materiaal te verzamelen bij elke proef.

Verfijning. Alle procedures zijn uitvoerig getest door ons en onze collega's. Wij onderhouden nauw contact met andere laboratoria die IUE elektroporaties uitvoeren, waardoor wij up to date blijven met de expertise in het veld. Experimenten zullen opeenvolgend uitgevoerd worden en waar nodig zullen kleine karakterisatiestudies gedaan worden om te bepalen hoe het grootst mogelijke resultaat behaald kan worden met zo min mogelijk dieren.

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

Na de operatie zullen moederdieren dagelijks gecontroleerd worden op diverse parameters (gewicht, groei, vacht conditie, gedrag). Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en geschoolde onderzoekers. De chirurgische ingrepen zullen plaatsvinden onder adequate anesthesie en peri-operative pijnstilling. De dieren zullen dagelijks worden gemonitord door middel van wegen. Dit zal een goede indruk geven of de zwangerschap normaal verloopt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Wij onderhouden nauw contact met collega's en zijn op de hoogte van de wetenschappelijke literatuur over dit onderwerp, waardoor herhaling niet voor komt.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Alle operaties zullen plaatsvinden onder anesthesie en adequate pijnstilling.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Na de operatie wordt een dier mogelijk apart gehuisvest. Er zijn zelden complicaties tijdens de ingreep. De dieren zullen nauwlettend worden gemonitord. Bij uitzondering (<1% in praktijk) kunnen de embryo's komen te overlijden na de ingreep, dit kan een abortus veroorzaken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Dieren worden apart gehuisvest om te kunnen herstellen van de operatie. Door de elektroporatie kan het voorkomen dat een moeder een embryo verliest door een abortus (<1% in praktijk).

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

Er is ruime expertise aanwezig om ervoor te zorgen dat het aantal complicaties minimaal zal zijn. Alle procedures worden uitgevoerd door ervaren onderzoekers. De dieren ontvangen voldoende pijnstilling om pijn te verlichten en stress te voorkomen. De dieren zullen gezamenlijk worden gehuisvest wanneer meerdere dieren zijn geopereerd. Peri-operatieve monitoring zal zorgvuldig uitgevoerd worden aan de hand van welzijnsdagboeken. In het geval van complicaties, zoals bijvoorbeeld slecht herstellen van de operatie, zal het dier nauwkeurig onderzocht worden om tot een goede beslissing te komen.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren zullen nauwlettend in de gaten gehouden worden. Wanneer meer tekenen van ongerief worden vertoond dan verwacht, bijvoorbeeld >20% gewichtsverlies ten opzichte van het begingewicht, abnormaal/onverwachts gedrag, slechte verzorging en/of een gebogen rug of de wond hersteld slecht of niet compleet na operatie, worden de dieren getermineerd.

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

Verwachting is dat dit zal plaatsvinden bij <1% van de gevallen.

K. Classificatie van ongerief

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

Dier	Percentage dieren	Handeling	Ongerief
Moederdier	100%	Oppakken, handelen	Licht
	100%	Anesthesie	Licht
	100%	Operatie	Matig
	100%	Cervicale dislokatie	Licht
Embryo's	100%	<i>In utero</i> elektroporatie	Matig
	100%	Decapitatie	Licht

Cumulatief ongerief voor zowel de moedermuizen als de embryo's wordt daarom ingeschat als matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

x Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Het brein zal uitgerepareerd worden en gebruikt voor verdere analyses. De moeder en de embryo's zullen onverdoofd worden gedecapiteerd om de volgende redenen: (1) sedatie door inhalatie of injectie veroorzaakt een sterke stressrespons in de dieren. Verhoogde corticosteron niveaus hebben een aangetoonde grote invloed op moleculaire, biochemische en fysiologische processen. Om deze processen zo natuurlijk mogelijk te kunnen bestuderen, wordt deze stressrespons hiermee voorkomen. (2) De meeste verdovingsmiddelen hebben een interactie met de processen die hier bestudeerd worden. CO₂ induceert bijvoorbeeld acidose, en veel anesthetica beïnvloeden neurotransmissie en biochemische signaal transducties. (3) Onverdoofde decapitatie is uitgebreid bediscussieerd en geaccepteerd door verscheidene DEC comités in de afgelopen jaren. We hebben deze methode als onze standaardmethode overgenomen, en al onze studies van de afgelopen jaren zijn op deze manier uitgevoerd. Voor de vergelijkbaarheid van de huidige met de toekomstige resultaten, zouden we deze manier van decapiteren graag toepassen in dit huidige protocol.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Virale injecties evt. gevolgd door salt loading en/of in vivo imaging

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Ons doel is om via virale injecties biologische processen in de hersencellen te labelen met fluorescente eiwitten. Door gemodificeerde virussen te gebruiken die fluorescente eiwitten tot expressie brengen en die direct in de hersenregio's van jong volwassen te injecteren, kunnen we heel specifiek neuropeptide vesicles, synapsen en axonen labelen in de target cellen. Uit onze pilot experimenten is gebleken dat na enkele dagen expressie van de fluorescente eiwitten waar te nemen is, en kunnen de hersenen van de dieren gebruikt worden voor het bestuderen van afgiftemechanismen van neuropeptiden. Specifiek voor het neuropeptide oxytocine zal indien de expressie niet op waarneembare niveaus komt 2% zout aan het drinkwater worden toegevoegd om expressie van dit neuropeptide te verhogen. Deze methode wordt gebruikt bij onze collega Prof. Grinevich in Heidelberg en werkt zeer efficiënt (Knobloch et al., 2012).

Na de virale injecties worden de hersenen gebruikt voor bereiden van hersenplakken, of de levende dieren worden gebruikt voor imaging van neuropeptide transport en afgifte. In beide gevallen staan de hersencellen met elkaar in verbinding en worden omgeven door hun ondersteunende glia cellen. Primaire uitkomstparameters zijn: neuropeptide vesicle-dynamiek (snelheid en richting parameters), aantal vesicle fusie-events na stimulatie (door middel van elektrische stimulatie of via optogenese), en locatie van fusie-events. Deze kwantitatieve parameters worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wild-type nestgenoten.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de

behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Deze procedure bestaat uit de volgende stappen:

1. Applicatie van virale particles in breinen van (jong) volwassen muizen en ratten door middel van een stereotactische operatie. Met behulp van Bregma coördinaten van de muis/rat-hersenenatlas kan zeer nauwkeurig de hersenenregio van interesse worden getarget. Het virus zal met behulp van een fijne naald in het brein van volwassen muizen en ratten ingebracht worden (SOP bijlagen in de werkprotocollen). Dit gebeurt onder adequate anesthesie en preoperatieve pijnstilling. Experimenten voor de karakterisatie van de DNA constructen zullen worden gebruikt om de expressieniveaus te bepalen van virale particles die nog niet eerder getest zijn.

2. Indien, naar aanleiding van de resultaten van het karakterisatie-experiment, de expressie van het neuropeptide oxytocine te laag blijkt om waar te nemen, zal salt loading worden toegepast. Dit zal gebeuren na een voldoende herstelperiode door 2% NaCl (w/v) aan het drinkwater toe te voegen.

3a. Een deel van de dieren zullen geofferd worden door middel van cervicale dislocatie op verschillende tijdstippen na het inbrengen van de virale particles, afhankelijk van construct en vraagstelling. Cervicale dislocatie en decapitatie zullen zonder verdoving worden uitgevoerd, omdat anesthetica inwerken op de hersenen. Anesthetica hebben invloed op eiwitcomplexen en synaptische netwerken, waardoor ze tot een verstoord beeld leiden en interfereren met dit onderzoek. Indien salt loading wordt gebruikt, zal dit op minimaal 2 dagen na het aanbieden van 2% NaCl geschieden. Dit zal beschreven worden in de werkprotocollen. Het brein zal worden gedissecteed en verder gebruikt worden voor analyses.

3b. Op basis van de resultaten van punt 3a, kan er besloten worden tot *in vivo* imaging. Een deel van de dieren zal tijdens de applicatie zoals beschreven onder punt 1, een glazen venster aangebracht krijgen in de schedel van de muis en ratten (Knobloch et al., 2012). Dit alles zal plaats vinden tijdens dezelfde operatie als beschreven in punt 1. Twee van onze AIOs en een analist hebben een uitgebreide training ondergaan in het plaatsen van craniale windows bij muizen in het lab van Prof. Grinevich. Tijdens deze training behaalde wij een successrate van 90%.

De dieren worden gemonitord zoals beschreven in bijlage 1. Na een herstelperiode zullen de dieren onder anesthesie gebracht worden en gefixeerd worden onder een two-photon microscoop, om zo neuropeptide dynamiek te imagen door het glazen window.

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

Kwalitatieve analyse:

Wij schatten de uitval van dieren door te lage expressie van de constructen en/of mistargeting van de doelgebieden op 10% van de geïnjecteerde dieren.

Kwantitatieve analyse:

Neuropeptide dynamiek en fusie zal worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wildtype littermates. Experimenten voor het neuropeptide oxytocine zullen worden uitgevoerd in ratten. Power analyses zullen worden gebruikt om de groepsgrootte te bepalen. Uit ons *in vitro* onderzoek verwachten wij een effect size van 20%. Groepsgrootte calculaties zijn uitgevoerd met de volgende parameters p-value van 0.05 en een power van 80%. Deze waarden worden standaard toegepast in wetenschappelijk onderzoek en zijn internationaal geaccepteerde normen voor een statistisch betrouwbare proef. Op basis van onze resultaten uit *in vitro* onderzoek verwachten wij een effect size van 20%. Samen met een verlies van 10% van de dieren,

zoals uitgelegd in de vorige alinea, resulteert dit in 91 dieren per experiment.

De aantallen zijn als volgt berekend:

Voor de virale injectie zal uitgegaan worden van effect size van 20% , $\alpha=0.05$ en een power van 0.80. Met een poweranalyse kan dan de groepsgrootte worden bepaald voor een goede statistische analyse: voor een Wilcoxon-Mann-Whitney test zijn 325 metingen per experiment per groep nodig. Van viraal geïnjecteerde dieren zullen veelal hersenplakken gemaakt worden. Gemiddeld kan per hersenplak 2 metingen worden gedaan. Van een volwassen dier kunnen 4 hersenplakken bereid worden met de regio van interesse. Voor de Mann-Whitney zijn daarom (325 metingen/8 metingen per dier=) 41 dieren nodig per experimentele groep. Een typisch experiment bestaat uit een experimentele groep (een knock-out dier) en een controlegroep (wild-type littermates). De controlegroep is essentieel om een vergelijking te kunnen maken tussen de mutant dieren en de wild-type situatie. Voor beide groepen accepteren we een gelijke foutmarge (0.05) en power (0.8) voor een statistisch betrouwbare proef, waardoor de groepsgrootte voor beide groepen gelijk is. Daarom zijn 82 dieren nodig om één experiment uit te voeren. Tijdens dit onderzoek zal rekening gehouden worden met een verlies van 10%, door uitval van dieren als gevolg van de operatie, mistargeting van het DNA construct en lage elektrofysiologische activiteit van de hersencellen na de bereiding van hersenplakken. Het aantal dieren per experiment komt dan op 91 dieren.

Voor onderzoek op wild-type muizen worden 3 experimenten ingecaluleerd om de 3 subonderzoeksvragen te beantwoorden (zie projectvoorstel 3.4.1). Daarom zullen (3x91 dieren) 273 wildtype dieren benodigd zijn voor dit onderzoek. Voor onderzoeken op mutante muizen zullen 7 experimenten ingecaluleerd worden, overeenkomend met 637 muizen. Hiervan zal de controlegroep bestaan aan wildtype muizen. Deze dieren zullen ingezet worden om onderzoeksvragen te beantwoorden die betrekking hebben tot de eiwitten en calcium sensoren voor neuropeptideafgifte.

De experimenten voor oxytocine zullen uitgevoerd worden in ratten. Hiervoor zijn 3 experimenten ingecaluleerd, om de 3 subonderzoeksvragen te beantwoorden (zie projectvoorstel 3.4.1.), gelijk aan 273 ratten. Wanneer de expressie van het neuropeptide oxytocine te laag is, zal salt loading toegepast worden. Salt loading heeft alleen effect op het neuropeptide oxytocine, en zal niet worden toegepast voor andere neuropeptiden. Er zijn drie onderzoeksvragen die betrekking hebben tot oxytocine. Daarom zal op maximaal (273 ratten + 10% loss=) 301 salt loading worden toegepast. Omdat dit een extra behandeling is na de operatie, neemt het aantal dieren hierdoor niet toe.

In vivo imaging zal enkel toegepast worden wanneer relevante resultaten zijn behaald in hersenplakken van muizen en/of ratten. Onze ervaring leert dat 25% van de experimenten aanleiding geeft tot vervolgonderzoek *in vivo*. Daarom zullen 3 à 4 van de in totaal 13 onderzoeken (3 wildtype muis, 7 mutant muis, 3 rat) vervolgd worden *in vivo*. Er zullen dus maximaal 364 dieren worden gebruikt voor *in vivo* imaging, plus 10% verlies, is 401 dieren. Omdat dit een beslissing is die wordt gemaakt op basis van de resultaten van de eerste onderzoeken, zijn er nieuwe dieren nodig voor het plaatsen van het glazen window. Het totaal aantal dieren van alle onderzoeken komt hierdoor op 1667 dieren.

Neuropeptiden moduleren vele lange-termijn processen. Voorbeelden daarvan zijn synaps-aantallen, synapsmorfologie, neuronale exciteerbaarheid, axonale connectiviteit en dense-core vesicle fusie processen. Omdat deze veranderingen traag zijn, is het van belang om de dieren op meerdere tijdstippen te kunnen

imagen over een periode over enkele weken tot maanden. De dieren zullen een imagingsessie ondergaan van maximaal 60 minuten per sessie, met een maximum aantal imagingsessies van 20 keer, en maximumfrequentie van twee maal per week. Hiermee zal het tijdsbestek van morfologische en fysiologische veranderingen voldoende worden gevangen en kan adequaat antwoord worden gegeven op de eerder gestelde onderzoeksvragen.

Experiment	Aantal dieren
Muizen voor karakterisatie constructen DNA	46
Ratten voor karakterisatie constructen DNA	46
Wildtype muizen	273
Mutant muizen	637
Ratten (evt. Incl. salt loading)	301
<i>In vivo</i> imaging muis	273
<i>In vivo</i> imaging rat (evt. Incl. salt loading)	91
Totaal	1667

B. De dieren

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

Diersoorten en herkomst: Voor dit experiment worden muizen en ratten aangekocht bij een erkende fokker en of worden geleverd door een onderzoekslab van Prof. Valery Grinevich in Heidelberg waarmee wij nauwe samenwerking onderhouden.

Geslacht: Voor de virale injecties worden mannetjes en vrouwtjes gebruikt.

Levensstadia: dieren vanaf P1 kunnen gebruikt worden voor de virale injecties.

Geschatte aantallen: over een periode van vijf jaar zullen 1667 dieren virale injecties ontvangen, waarvan maximaal 392 ratten daarnaast ook salt loading zullen ontvangen, indien nodig. Van de 1667 dieren worden maximaal 364 dieren ingezet voor *in vivo* imaging. Het aantal benodigde dieren is gebaseerd op onze ervaring en de ervaring van andere labs waar deze technieken worden gebruikt. De schatting is gebaseerd op het aantal betrokken onderzoekers en valt binnen het bereik van de beschikbare fondsen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging. Voor deze proeven is geen *in silico* vervanging mogelijk. Voor studies naar biologische processen in het brein zijn muizen en ratten de beste modellen vanwege de mogelijkheid van genetische modificatie (knock-outs).

Vermindering. Door statistisch onderbouwde groepsgrootte en onze eerder opgebouwde ervaring kunnen we het aantal benodigde dieren zo klein mogelijk houden. De procedures beschreven in de project zijn gebaseerd op wetenschappelijke en experimentele ervaring in muizen. Alle chirurgische handelingen en imaging technieken zijn volledige geoptimaliseerd. Power calculaties voor groepsgroottes met realistische parameters zorgen dat het minimaal aantal dieren gebruikt zal worden en toch waardevolle data verkregen zal worden.

Verfijning. Alle procedures zijn uitvoerig getest door ons en onze collega's. Wij onderhouden nauw contact met andere laboratoria die virale injecties uitvoeren, waardoor wij up to date blijven met de expertise in het veld. Wij proberen zo optimaal mogelijk te werken door zoveel mogelijk materiaal te verzamelen bij elke proef. Experimenten zullen opeenvolgend uitgevoerd worden en waar nodig zullen kleine karakterisatiestudies gedaan worden om te bepalen hoe het grootst mogelijke resultaat behaald kan worden met zo min mogelijk dieren.

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

De dieren zullen dagelijks gecontroleerd worden op diverse parameters (gewicht, groei, vacht conditie, gedrag). Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en geschoolde onderzoekers. Waar mogelijk zullen de ingegrepen plaatsvinden onder adequate anesthesie en peri-operatieve pijnstilling. Er zal na de ingreep een pijnstillend middel worden gegeven.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Wij onderhouden nauw contact met collega's en zijn op de hoogte van de wetenschappelijke literatuur over dit onderwerp, waardoor herhaling niet voorkomt.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse

verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Chirurgische ingrepen zullen worden uitgevoerd onder anesthesie en peri-operatieve pijnstilling.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er zijn zelden complicaties tijdens de ingreep. De dieren zullen nauwlettend worden gemonitord. Wanneer een dier meer tekenen van ongerief vertoont dan verwacht, wordt het dier getermineerd.

Na de operatie wordt een dier mogelijk apart gehuisvest.

Bij de dieren waarbij een glazen venster is aangebracht bestaat de mogelijkheid dat het venster loslaat. Deze dieren zullen direct getermineerd worden. Ervaring leert ons dat het venster erg stabiel is en blijft het venster zonder problemen voor meer dan een jaar op het dier aanwezig kan blijven.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Hoewel het zelden voorkomt, heeft elke (chirurgische) ingreep de kans op onverwachte nadelige effecten. Geopereerde dieren worden met elkaar gehuisvest, maar wanneer slecht één dier een operatie heeft ondergaan, zal deze apart gehuisvest worden.

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

Er is genoeg expertise aanwezig om ervoor te zorgen dat het aantal complicaties minimaal zal zijn. Alle procedures worden uitgevoerd door zeer ervaren onderzoekers. De dieren ontvangen voldoende pijnstilling om pijn te verlichten en stress te voorkomen. De dieren zullen gezamenlijk worden gehuisvest wanneer meerdere dieren zijn geopereerd. Peri-operatieve monitoring zal zorgvuldig uitgevoerd worden aan de hand van welzijnsdagboeken. In het geval van complicaties, zoals slecht herstellen van de operatie, zullen de dieren nauwkeurig onderzocht worden om een beslissing te maken.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

xJa > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren zullen nauwlettend in de gaten gehouden worden. Wanneer meer tekenen van ongerief worden vertoond dan verwacht, bijvoorbeeld >20% gewichtsverlies ten opzichte van het hoogste gemeten lichaamsgewicht, abnormaal/onverwachts gedrag, slechte verzorging en/of een gebogen rug of de wond hersteld slecht of niet compleet na operatie, worden de dieren getermineerd.

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

De verwachting is dat dit zal plaatsvinden bij <1% van de gevallen.

K. Classificatie van ongerief

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

Dier	Percentage dieren	Handeling	Ongerief
Muis of rat voor hersenplakken	100%	Oppakken, handelen	Licht
	100%	Anesthesie voor operatie	Licht
	100%	Operatie: virale injectie	Matig
	20%	Operatie: plaatsen glazen window	Matig
	16,8%	Salt loading	Matig
	20,3%	Anesthesie voor imaging	Licht
	100%	Decapitatie	Licht

Het cumulatief ongerief voor zowel muis als rat word ingeschat als matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

xJa > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Het brein zal uitgerepareerd worden en gebruikt voor verdere analyses. De dieren zullen onverdoofd worden gedecapiteerd om de volgende redenen: (1) sedatie door inhalatie of injectie veroorzaakt een sterke stressrespons in de dieren. Verhoogde corticosteron niveaus hebben een aangetoonde grote invloed op moleculaire, biochemische en fysiologische processen. Om deze processen zo natuurlijk mogelijk te kunnen bestuderen, wordt deze stressrespons hiermee voorkomen. (2) De meeste verdovingsmiddelen hebben een interactie met de processen die hier bestudeerd worden. CO₂ induceert bijvoorbeeld acidose, en veel anesthetica beïnvloeden neurotransmissie en biochemische signaal transductie. (3) Onverdoofde decapitatie is uitgebreid bediscussieerd en geaccepteerd door verscheidene DEC comités in de afgelopen jaren. We hebben deze methode als onze standaardmethode overgenomen, en al onze studies van de afgelopen jaren zijn op deze manier uitgevoerd. Voor de vergelijkbaarheid van de huidige met de toekomstige resultaten, zouden we deze manier van decapiteren graag toepassen in dit huidige protocol.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja



Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Gegevens aanvrager

1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam van de portefeuillehouder	[REDACTED]
KvK-nummer	53815211
NVWA deelnemernummer	11200

2 Gegevens gemachtigde

2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.

<input type="checkbox"/> KvK-nummer	[REDACTED]
<input checked="" type="checkbox"/> BSN	[REDACTED]

2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Adres of postbus	[REDACTED]	
Postcode en Plaats	[REDACTED]	Amsterdam

3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken? Ja > Ga door naar vraag 4
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?
- Een projectvergunning aanvragen
 - Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
 - Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
 - Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.
 - Alle bovenstaande opties

4 Ondertekening

- 4.1 Ondertekenen het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde	[Redacted]
Datum	0 2 - 0 9 - 2 0 1 6
Handtekening portefeuillehouder van de instelling	[Redacted]
Handtekening gemachtigde	[Redacted]

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11200
2. Titel van het project:
Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein
3. Titel van de NTS:
Mechanismen van neuropeptideafgifte en -transport
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *20-07-2016*
 - aanvraag compleet: *20-07-2016*
 - in vergadering besproken: *13-09-2016 en 08-11-2016*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *04-10-2016 en 09-01-2017*
 - advies aan CCD: *16-1-2017*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *20-07-2016*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *20-09-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC meer uitleg over de samenhang, de achtergrond, de context en de humane eindpunten. De leeftijd van de dieren moet duidelijker worden weergegeven. Enkele tekstuele en lay-out opmerkingen.*
- Datum antwoord: *04-10-2016*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De aanvraag zal besproken worden tijdens de plenaire vergadering van 8 nov 2016.*

Vraagronde 2

- Datum: 09-11-2016
- Strekking gestelde vragen: *De NTS en aantallen moet nog aangepast worden conform de veranderingen in de rest van de aanvraag.*
- Datum antwoord: 09-01-2017
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
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 individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: *N.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is het onderzoeken van de mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en -signalering in de hersenen, en richt zich op de effecten van neuropeptideafgifte op de lokale netwerkactiviteit.*

5. *Het uiteindelijke doel van de studie is deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen. Neuropeptiden zijn verder betrokken bij allerlei neurologische en psychiatrische processen, zoals angst en stemmingsstoornissen, autisme, overgewicht en epilepsie.*
6. *De fundamentele kennis is nodig om de afgifte en regulatie van neuropeptiden beter te begrijpen, en zal bijdragen aan onderzoek naar de onderliggende mechanismen van neuropeptide-dysfunctie bij patiënten met hersenaandoeningen.*

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

7. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het onderzoeken van de mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en -signalering in de hersenen: de proefdieren, de onderzoekers en in de toekomst de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De fundamentele kennis zal bijdragen aan het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen. Ook mensen met neurologische en psychiatrische aandoeningen, zoals angst en stemmingsstoornissen, autisme, overgewicht en epilepsie kunnen voordeel hebben bij de resultaten van dit onderzoek.

8. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *N.v.t.*

Proefopzet en haalbaarheid

9. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

10. 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.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De

voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen op termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor hersenaandoeningen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.

Welzijn dieren

11. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.

12. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Na de operatie wordt een dier apart gehuisvest om te kunnen herstellen van de operatie.

13. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Er wordt licht ongerief verwacht bij alle dieren als gevolg van handelingen, anesthesie en doden. Matig ongerief wordt verwacht ten gevolge van de operatie (virale injectie of plaatsen van glazen window), salt loading en in utero elektroporatie. De humane eindpunten zullen worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen.

14. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan.

15. 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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht, gedrag of de dieren niet herstellen na de operatie. De verwachting dat dit zal plaatsvinden is echter heel klein (< 1 %).

3V's

16. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Er zijn zoveel mogelijk metingen uitgevoerd in in vitro-preparaten, waaronder zenuwcellen verkregen uit stamcellen. Het doel van dit onderzoek is om de mechanismen van neuropeptide-

afgifte en het effect van deze afgifte op de ontvangende hersengebieden te bestuderen, hiervoor zijn intacte hersengebieden nodig. Voor de onderzoeksvragen in deze studie zijn op dit moment geen niet-invasieve technieken beschikbaar, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

De keuze voor het gebruik van muizen en ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De muis is het best bestudeerde model op het gebied van de neurobiologie. Hierdoor kan men de resultaten vergelijken met andere (inter)nationale onderzoekslaboratoria. De beschikbaarheid van transgene muizenmodellen is essentieel om onderzoek te kunnen doen naar de mechanismen van neuropeptide-afgifte. In één specifiek geval zal men gebruik maken van ratten: als blijkt dat de expressie van oxytocine in de muizenhersenen niet hoog genoeg is om dit te kunnen waarnemen, zal men ratten gebruiken, omdat ratten dit neuropeptide in veel hogere mate tot expressie brengen dan muizen.

17. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Verder worden er uit 1 dier meerdere gegevens (hersensplakken) gehaald, waardoor er minder dieren nodig zijn.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 3693 muizen en 438 ratten en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

18. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

De dieren krijgen tijd om te acclimatiseren en worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel.

19. 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: N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

20. 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? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

Voor type dierproef 1 zal men gebruik maken van zwangere vrouwelijke muizen, daarnaast zullen muizen embryo's van beide geslachten worden gebruikt. Voor type dierproef 2 zal men gebruik maken van dieren van beide geslachten, dus zowel vrouwelijke als mannelijke muizen en ratten.

21. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

De dieren worden gedood om de hersenen verder te kunnen analyseren. De dieren zullen worden gedood door onverdoofde decapitatie. Dit is noodzakelijk omdat de meeste verdovingsmiddelen interactie vertonen met de onderzoeksprocessen. Sedatie verhoogd de corticosteron levels, welke invloed hebben op de moleculaire biochemische en fysiologische processen. Deze manier van doden is uitgebreid bediscussieerd en geaccepteerd door verschillende DEC comités in de afgelopen jaren en de huidige IvD en DEC zijn het hiermee eens.

22. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Dit is niet mogelijk omdat er post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

23. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en daarmee de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen het gebruik van maximaal 3693 muizen en 438 ratten in de dierproef die daarvan maximaal matig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een therapie voor de behandeling van neuropeptiden gerelateerde hersenaandoeningen.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 3693 muizen en 438 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van kennis over neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is onderzoeken welke mechanismen ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en –signalering in de hersenen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen, is afgewogen tegen het, als maximaal matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 3693 muizen en 438 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het wetenschappelijk en indirecte maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de mechanismen van neuropeptideafgifte en zullen indirect bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk belang en indirect maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 3693 muizen en 438 ratten en het daarbij verwachte maximaal matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

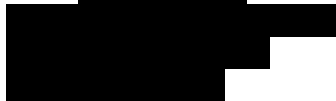
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B).

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam
T.a.v. [REDACTED]



**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
AVD112002017824
Bijlagen
2

Datum 17 januari 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 januari 2017. Het gaat om uw project "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD112002017824. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD112002017824

Datum:
17 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017824

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11200

Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Amsterdam

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 53815211

Straat en huisnummer: De Boelelaan 1105

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

IBAN:

Tenaamstelling van het
rekeningnummer:

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Datum:
17 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017824

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017

Geplande einddatum: 1 maart 2022

Titel project: Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein

Titel niet-technische samenvatting: Mechanismen van neuropeptideafgifte en -transport

Naam DEC: Dec-Vu-Vumc

Postadres DEC: [redacted]
Amsterdam

E-mailadres DEC: [redacted]

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD112002017824

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagenVerplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvattingOverige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies**Ondertekening**

Naam: [redacted]

Functie: [redacted]

Plaats: Amsterdam

Datum: 16 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam



**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
AVD112002017824
Bijlagen
2

Datum 17 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 januari 2017
Vervaldatum: 16 februari 2017
Factuurnummer: 170824

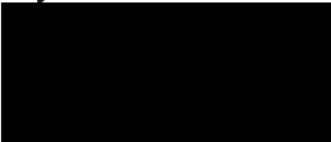
Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD112002017824	€ 1.287,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam



**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
AVD112002017824
Bijlagen
1

Datum 23 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 16 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein" met aanvraagnummer AVD112002017824. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat omdat de looptijd van de vergunning maximaal 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Dec-Vu-Vumc gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 januari 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:
23 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017824

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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


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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze: 

Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Amsterdam
Adres: De Boelelaan 1105
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11200

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein" met aanvraagnummer AVD112002017824, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dec-Vu-Vumc. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 januari 2017, ontvangen op 16 januari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 In Utero Elektroporatie				352 moedermuizen en 2112 embryo's
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / 352 moedermuizen en 2112 embryo's (E7-16); wiltype en KO muizen voor calciumsensoren	2.464	100% Matig	
3.4.4.2 Virale injecties evt. gevolgd door salt loading en/of in vivo imaging				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / Wildtypen en KO voor calciumsensoren	1.229	100% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	438	100% Matig	

Aanvraagnummer:
AVD112002017824

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 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:

AVD112002017824

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:

AVD112002017824

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.

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017825	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage animal procedure 1			x						
5	Bijlage animal procedure 2			x						
6	Bijlage animal procedure 5			x						
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
8	DEC advies				x		x	x		
9	Advies CCD		x						x	
10	Beschikking en vergunning				x		x	x		



18 JAN. 2017

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Maastricht Universiteit
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	50169181
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6
		Postbus	616
		Postcode en plaats	6200MD Maastricht
		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Maastricht University
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		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] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 3 - 2017
- Einddatum 1 - 3 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The role of serotonin in post-traumatic stress disorder
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het belang van de neurotransmitter serotonine bij posttraumatische stress stoornis (PTSS).
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres [redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 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 ondertekende 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 Maastricht 

Datum 16 - 1 - 2017 

Handtekening 



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.

Post-traumatic stress disorder (PTSD)

Experiencing intense terror as during combat situations or sexual violation can have devastating effects on a person's mental sanity. Flashbacks, often expressed in nightmares, confront the person with the

traumatic event otherwise avoided as much as possible in both actions and thoughts. A general hyperarousal debilitates the person and seriously constrains the outlook on the future. The combined symptomatology is referred to as post-traumatic stress disorder (PTSD), which has a lifetime prevalence of 5-8% globally (Kessler et al., 1995) and up to 35% in post-war countries (Priebe et al., 2010). Although not everybody experiencing the same traumatic event will eventually develop PTSD, conversely interpersonal differences in perceiving the level of the trauma make it considerably hard to study PTSD in experimentally reduced settings.

Faulty pattern separation processing

The mechanism of learned fear allows animals to generate adaptive responses to situations that threaten their safety on the basis of previous experiences. These responses take place, depending on time scale at the neurochemical (e.g. serotonin, catecholamines etc.), neuroendocrine (e.g. HPA-axis releasing corticotropin releasing hormones) and/or neuroanatomical level (e.g. hippocampus, amygdala etc.) (Sherin & Nemeroff, 2011). Based on simple classical conditioning principles, neutral stimuli repeatedly presented in close space-time association with the adverse event will eventually suffice in eliciting a conditioned fear response. New, non-identical but similar stimuli will not trigger the conditioned response in healthy subjects, but do so in subjects suffering from PTSD (Pitman et al., 2012). It is believed that faulty pattern separation processes, resulting in over-generalizing (Kheirbek et al., 2012) lay at the root of this pathological reaction. In such a scenario e.g. the smell of a summer BBQ is not distinguished anymore from the smell of burning human flesh during combat hence triggering the same aberrant behavior.

How to study faulty pattern separation processing in PTSD?

Using generalization gradient techniques this process can be studied at the behavioral level (Honig and Urcuoli, 1981). Responses to stimuli parametrically varied in similarity to an aversively conditioned stimulus (CS+) are compared and typically a gradient is observed, i.e. less fear response with more dissimilar stimuli. This process of pattern separation correlates with activity in the human hippocampal dentate gyrus (DG) and cornu ammonis (CA3) region, as revealed by fMRI (Bakker et al., 2008; Lissek et al., 2014). Hippocampal DG is known for its characteristic encoding of experiences in memory engrams, i.e. configurations of cells within a microcircuit representing specific memories (Liu et al., 2012; Redondo et al., 2014). Together with the olfactory bulb, the hippocampus retains the remarkable capacity of generating new neurons and implementing them into existing neural circuitry. This phenomenon, called adult neurogenesis, results from the presence of a specific neurogenic zone, i.e. the sub-granular zone of the dentate gyrus (van Praag et al., 2002). Ablation of adult hippocampal neurogenesis leads to impaired pattern separation in rodents respectively (Tronel et al., 2010) while increasing neurogenesis results in improved discriminability between two highly similar contexts (Sahay et al., 2011). Analysis of immunostained hippocampal tissue for neural progenitor cells (NPC) from patients with major depressive disorder (MDD) either treated with antidepressants or left untreated clearly showed a marked increase in the amount of NPC in the former group (Boldrini et al., 2009). This thus demonstrates a potential involvement of the serotonergic neuromodulatory system in mediating neurogenesis and hence the capacity to separate patterns (stimuli) adequately.

The role of the serotonergic system further explored

The serotonergic system originates from the dorsal raphe nucleus (DRN) and innervates a multitude of subcortical and cortical structures (Lesch and Waider, 2012) with prominent connectivity to the prefrontal cortex in the latter group (Raghanti et al., 2008). Selective activation of this serotonergic pathway in a transgene mouse (ePet1Cre) using optical stimulation of cells in the DRN genetically transfected with a light-sensitive cation channel ChannelRhodopsin2 (ChR2) dramatically improved sensory discrimination performance in an olfactory Go/No Go task (Liu et al., 2014). Besides projections from the DRN to prefrontal cortex, other prominent projections are from the DRN to the hippocampus (dentate gyrus - DG) and to primary auditory cortex (A1). Within the auditory system, associative fear memories can be supported by a merely neocortical microcircuit of disinhibition at the primary auditory cortex, A1 (Letzkus et al., 2011). Using light to activate specific cell types these researchers were able to completely abolish conditioned fear memory.

Research hypothesis

The relationship between deficits in pattern separation as a behavioral and experimental operationalization to study PTSD and the serotonergic system has not been explored previously. We aim to study the function of serotonergic neurons projecting from the DRN to other brain regions, more specifically to the hippocampus (dentate gyrus), prefrontal cortex and primary auditory cortex whilst our experimental subjects, i.e. mice, are engaged in a behavioral task probing pattern separation processing as a model to study PTSD.

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?
-

General goal

We speculate that the release of serotonin by the DRN increases hippocampal neurogenesis, allowing for better pattern separation between the original stimulus eliciting the fear responses and neutral stimuli, similar but not identical to this original stimulus. This would result in less over-generalization and reduced PTSD symptomatology. Providing the transient character of memory storage from subcortical to cortical structures (Arruda-Carvalho et al., 2014; Vangeneugden et al., 2015), together with the evidence of cortical microcircuits in encoding fear memories (Letzkus et al., 2011), we will also investigate the involvement of auditory cortex over time to the process of pattern separation and potential modulation of this microcircuit by serotonin. Finally we will also scrutinize the function of known anatomical projections from the DRN to the prefrontal cortex.

Building forth on the idea that faulty pattern separation is at the root of PTSD our goal is to utilize a three-pronged approach in order to dissect the underlying neural circuitry and formulate clinically relevant intervention strategies. We are particularly interested in the role of serotonin and the DRN in mediating the functional properties of this network. Due to considerable flexibility in experimentation and previously acquired knowledge we will use the auditory system of transgene mice (ePet1Cre) as the sensory modality of choice.

Specific goals

(1) Goal #1: Validation of behavioral paradigm

Develop and validate a new behavioral contextual fear conditioning task in mice allowing measurement of the level of generalization between similar but not identical auditory stimuli by measuring freezing response. This will be studied in 60 ePet1Cre mice, both males and females.

(2) Goal #2: Determine structural connectivity

Document the vast connectivity between the DRN and other brain regions, of subcortical and cortical origin, using tracer injections and post-hoc fluorescence histology. For this purpose we will re-use animals (N = 20; male and female) randomly selected from the behavioral experiment of goal #1.

(3) Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation

Investigating the behavioral relevance of the anatomical connections found under Goal #2 by manipulating the neural network in-vivo in awake and behaving mice engaged in the tasks validated under Goal #1, using gene targeting with artificial cation channels activated by light stimulation, i.e. optogenetic neuromodulation. We will further correlate observed behavioral changes in the fear conditioning tasks due to optogenetic neuromodulation with electrophysiological patterns, i.e. action potentials. Here we will also specifically examine the role of serotonin in fear conditioning during either the acquisition phase, the retrieval phase or both phases. A total of 220 ePet1Cre mice (male and female) will be engaged in these optogenetic experiments.

A table is presented here (Table 1) to clarify the goals of this project proposal more clearly. Components of the table will be explained here (in this general outline), but also more specifically in the adhering Appendices.

	Short description	Mice	Extra information
Goal #1: Validation of behavioral paradigm	Using auditory fear conditioning paradigm to obtain freezing tuning curves.	#60 males + females ePet1Cre line	
Goal #2: Determine structural connectivity	Using post-mortem fluorescence histology to determine most prominent target projection areas from dorsal raphe nucleus (DRN).	#20 males + females ePet1Cre line (re-used from Goal #1)	
Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation	Using optogenetic neuromodulation to selectively increase serotonin release, separately for the different target projection areas (dentate gyrus - DG, prefrontal cortex (PFC) and primary auditory cortex (A1)), and observe effect on freezing tuning curves.	#220 males + females ePet1Cre line	All experiments: Cre-dependent viral vector Chr2 + #10 sham-injections Cre-independent virus Subgoal #1: General excitation of neural activity in DRN using pan-neural promoter (CaMKII) in #40 mice. [#30 actual experiment + #10 pilot] Subgoal #2: General excitation of serotonin neurons in DRN using Cre-dependent promoter (EF1.DIO) with light fiber stimulation over DRN in #70 mice, during acquisition phase, retrieval phase or both phases [#20 acquisition, #20 retrieval, #20 both, #10 control] Subgoal #3: Target specific excitation of serotonin neurons separately for DRN-DG, DRN-PFC and DRN-A1 projections, in #20 mice each. Similar as subgoal #2 but now placement of light fiber over different target areas. [#70 mice in total] Subgoal #4: Electrophysiological recording from target area with the most promising behavioral outcome, i.e. largest effect on freezing tuning curve. [#40 mice in total].

Table 1 | Different goals of project proposal with a short description and mice engaged in the experiments. More information can be found in the separate Appendices.

3.3 Relevance

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

PTSD, the most prevalent anxiety disorder, was for long conceptualized merely in psychological terms, i.e. as a blend of intrusive memories of a traumatic event, avoidance of reminders of it, emotional numbing and hyper arousal (Pitman et al., 2012). Gradually more research and insight into the underlying neurobiological mechanisms in PTSD have emerged, however these studies mainly focused on prefrontal cortex, amygdala and dorsal anterior cingulate cortex. More recently, evidence for the involvement of the hippocampus with its remarkable capacity to generate new neurons, functionally relevant in separating between highly similar events has been postulated (Kheirbek et al., 2012).

Observational studies have demonstrated that the serotonergic system impinges on hippocampal neurogenesis (Dranovsky and Hen, 2006; Boldrini et al., 2009) however how this may relate to altered pattern separation is still a matter of debate. Moreover the exact location of stored fear memories, being the hippocampus, prefrontal cortex and/or auditory cortex, and the influence of the serotonergic system onto this memory representation, is largely unknown. In this project we wish to elucidate the role of the serotonergic system on hippocampal neurogenesis, pattern separation and the potential involvement of other brain structures influenced by serotonin release, such as the prefrontal and auditory cortices, in the development of PTSD.

These results could potentially yield improvement in the therapy of PTSD in human patients, by combining more cognitive psychotherapeutic interventions, inspired to increase pattern separation, with a pharmacological tailored level of serotonin, using SSRIs, medication mainly used to treat major depressive disorders.

3.4 Research strategy

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

In order to examine the role of serotonin in PTSD we will apply a number of state-of-the-art neuromodulatory interventions (Goal #3) at different nodes within the underlying neural circuitry (Goal #2) whilst meticulously observing behavioral changes using auditory fear conditioning protocols (Goal #1).

After validating our behavioral assay as good a proxy for studying PTSD in a mouse model, we will use genetic interventions to upregulate serotonin release within the circuitry. In order to know where to impinge in the circuitry we will also perform structural connectivity mapping. Once we have determined the key players within the circuit and have provided evidence for their behavioral involvement in PTSD symptomatology, we will use optogenetic interventions to intervene in a more acute manner in the serotonergic system. These behavioral observations will be supplemented with electrophysiological recordings of action potentials from different nodes in awake behaving mice.

For all our experiments we will use transgene ePet1Cre mice, expressing cre-recombinase in all serotonergic cells. Injecting these mice with a Cre-dependent virus will only express virus in serotonergic cells.

Goal #1: Behavior

The behavioral task will be based on an existing human protocol (Lissek et al., 2014), but adapted for the mouse. We will associate a tone of a particular frequency at either side of a range of frequencies (5 – 15 kHz) with a mild electric shock (1 sec, .6 mA; cf. previously published fear conditioning studies, e.g. Letzkus et al., 2011) (see Goal #1. *Validation of behavioral paradigm*). The other tones will not be associated with the shock. As an operant for fear/anxiety we will use freezing behavior, again cf. previous studies (Letzkus et al., 2011; Wolff et al., 2014). Prey animals (mice) that experience fear will resort to feigning being death as a final escape mechanism. The amount of freezing to other non-associated tones will provide a measurement for generalization/separation.

Goal #2: Projections

The exact projections from the DRN to other brain regions will be determined in a separate group of ePet1Cre mice injected with a Cre-dependent tracer virus in the DRN. Fluorescence imaging of the acquired post-mortem slices will specifically instruct us which projection areas to target (see Goal #2. *Determine structural connectivity*).

Goal #3: Function

Optogenetically, we will target the DRN and the projections of the DRN to other structures, such as dentate gyrus (DG), prefrontal (PFC) and primary auditory (A1) cortices, using ChannelRhodopsin2 (ChR2), an artificial light-gated cation channel ('genetics') that pumps sodium into the cell when illuminated by blue light ('optics'). This then causes depolarization of the cell's membrane and gives rise to action potentials.

We will monitor these neural manipulations on both behavior and electrophysiological signatures (see 3. *Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation*). As the DRN contains multiple cell types and consensus over the functional properties of these different cell populations and their microcircuitry has not yet been reached (Liu et al., 2014; McDevitt et al., 2014) we will first apply a general approach, targeting all DRN cells and all projections to the abovementioned brain areas (ChR2-CaMKII virus in transgene ePet1Cre mice).

In a second phase we will employ a Cre-dependent ChR2 virus in the transgene ePet1Cre mouse strain in

order to specifically target serotonergic cells only and their respective projections, again to these abovementioned brain areas. Within the field of systems neuroscience these kind of injections are now mainstay and considered safe to use for the experimenter and the animal. No apoptosis or cell damage has been reported even in prolonged experiments with more than needed viral dosages (for review see Yizhar et al., 2011).

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.

Goal #1. Validation of behavioral paradigm (fear conditioning)

The first objective will focus on the development and validation of a new behavioral contextual fear conditioning task allowing measurement of the level of generalization between similar but not identical stimuli. These experiments will be non-invasive and do not require any procedure other than handling and training. Mice will be exposed only once and very briefly to an electric shock during the learning phase.

In line with a recent protocol applied in human fMRI (Lissek et al., 2014) we will associate one tone (e.g. 15 kHz) with a foot shock (CS+) in the training phase, while presenting this tone and other tones on a parametrically varied axis (steps of 2.5 kHz to 5 kHz: 12.5, 10, 7.5 and 5, i.e. GSs or generalization stimuli) without an aversive event during this test phase. For more information on the behavioral paradigm, please see Appendix 1 with an instructional figure also depicted.

As it has been shown that mice can significantly discriminate between tones differing only 2% (de Hoz and Nelken, 2014) we should consider piloting and hence adjusting the frequency range. This will be done in the first 5 mice. After obtaining data from these mice we will determine the average freezing tuning curve and based on the steepness of this curve, i.e. not too steep -> too much separation, not too shallow -> too little separation, we will adjust the differences between auditory tones accordingly, i.e. decrease or increase frequency differences respectively.

The amount of freezing behavior is considered as an anxiety operant. We expect our behavioral data to fall along an ascending line going from little (furthest GS-CS+ distance) to maximal freezing (closest GS-CS+ distance). The steepness of this line will be indicative of the level of generalization versus separation: steep, shallow and flat lines will point toward high, low and no perceptual discriminability respectively.

2. Structural connectivity

The DRN is one of many moderate-size clusters along the midline of the brainstem and harbors the somata of most serotonergic neurons in the brain (Jacobs and Azmitia, 1992). It receives input from a multitude of regions, notably the hypothalamus, cortex, basal ganglia and midbrain. Considerable hyper-direct inputs from prefrontal cortex and basal ganglia are present (Pollak Dorocic et al., 2014). To document the numerous projections arising from the DRN to other brain regions we will inject transgene ePet1Cre mice with a Cre-dependent tracer allowing expression of a fluorescent protein along the projecting axons followed by post-hoc histological analysis. Mice will be injected only once and will be sacrificed according to ethical guidelines after which transcardial perfusion will be performed to extract the brain. Slices will be made and examined using a fluorescence microscope. These 20 animals will be selected randomly from component #1 (Goal #1: Validation of behavioral paradigm), hereby reducing the total of mice needed in this project.

3. Optogenetic neuromodulation

To investigate a more acute role of serotonin in the process of pattern separation in PTSD and to explore the direct functionality of the different nodes within this circuitry, we will employ an optogenetic stimulation strategy in our ePet1Cre transgene mice. In order to study the effect of general excitation of the DRN we will inject ChR2-CaMKII (Channelrhodopsin; Calmodulin-dependent protein Kinase type II) virus in DRN, which expresses in all excitatory cells. This will be achieved in #30 ePet1Cre mice and will give us a rough overall idea of the total involvement of the DRN in the behavior when using optogenetics. Next, Cre-dependent virus to stimulate serotonergic cells (upregulation) specifically within the DRN and differentially at the different target locations, e.g. DRN to dentate gyrus (DG), DRN to prefrontal cortex

(PFC) or DRN to primary auditory cortex (A1), will be achieved by injecting virus in DRN which travels along axons of projecting neurons to these other brain regions. Firstly we will apply light stimulation over DRN itself in #50 mice, in a later phase we will implant the light fibers over the different projection areas, i.d. #20 transgene mice for each condition. These injections will be done using AAV5.EF1a.DIO.hChr2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH. In contrast to pharmacological interventions, optogenetics allows for millisecond temporal precision and thus does not evoke massive (short- or long-term) restructuring within the network (e.g. plasticity mechanisms). Furthermore this technique allows testing functional connectivity between different brain regions (Yizhar et al., 2011). The technique also allows to dissociate and test the effect of serotonin during the acquisition versus retrieval phase (or both phases) of fear conditioning.

Light fibers will be implanted bilateral in the DRN and at the different locations. Shining light over the target locations allows for modulating only the projections from the DRN to that target without interfering with the other nodes in the network. This entails the most accurate and pure examination of the circuitry. We will measure the effect of increasing serotonin at these different locations on the different behavioral tests. Control conditions consist of sham injections of saline in different ePet1Cre mice.

Based on the results from the behavioral observations with optogenetic stimulation, we will concentrate on the most interesting efferent projections from the DRN. Optrodes with multiple contact points for registering extracellular activity and an attached light fiber along the shank will be inserted into the target region. We will register single- and multi-unit together with local field potentials activity extracellularly. Recordings without light stimulation will yield information about the connectivity pattern (Liebe et al., 2012), while recordings with light stimulation will reveal the causative relationship between these two regions. These recordings will be made in awake mice engaged in our behavioral assay.

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.

All experiments are aimed at unraveling the role of serotonin in PTSD and fit nicely together into a coherent project. Before advancing to the initial aim of this endeavor, i.e. the optogenetic neuromodulation, we first need to work on two fronts. A schematic representation of the go / no-go characteristics is given in Table 2.

Firstly, we need to validate our behavioral paradigm (see *Goal #1. Behavioral task*). This will be achieved in transgene ePet1Cre mice, considering that we also need to disentangle specifically the serotonergic projections from the DRN it would be opportunistic (cf. Reduction) to use these mice also for the behavioral validation protocol and structural connectivity mapping.

Secondly, we need more knowledge on the underlying structural network of serotonergic projections arising from the DRN (see *Goal #2. Structural connectivity*). This will be achieved by, simultaneously with the behavioral validation, injecting transgene ePet1Cre mice with Cre-dependent fluorophores. Post-mortem histology will inform us on the most prevalent efferent connections from the DRN.

The information obtained from these first two components will then be combined in our optogenetic neuromodulatory experiment. We will interfere with default neural functioning whilst engaging our mice in the behavioral task (see *Goal #3. Optogenetic neuromodulation*). This approach will provide evidence for a possibly acute involvement of serotonin in buffering or facilitating PTSD symptomatology. Importantly, all experiments are constructed in a phased design fashion. Depending on the behavioral experiments we will continue with the structural mapping and depending on these results we will proceed with the optogenetic neuromodulation. Criteria for continuation for the different components are:

- Goal #1: Validation of behavioral paradigm

Observing freezing tuning curves, i.e. maximal freezing to the conditioned tone with gradually less freezing to more distinct tones. Maximal freezing does not need to be 100%. Minimal freezing should be equivalent to the amount of baseline 'freezing' measured at the beginning of each experiment, before fear conditioning, for each mouse.

- Goal #2: Determine structural connectivity

Obtaining high quality images of fluorescence with solid clusters of projections to different areas, such as dentate gyrus, prefrontal cortex and/or auditory primary cortex. It is not excluded that other brain regions could be significant projection areas from the DRN and/or that one of the three brain regions suggested here do not show to receive significant projections. In that case we will still select the three best projection areas and continue Goal #3 investigating these three regions.

- Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation

Within Goal #3 we will work with a phased design concerning the #4 different subgoals. If we do not see any significant behavioral change during general excitation of neural activity in DRN (subgoal #1), we will not continue with the subsequent subgoals. If we do not observe significant behavioral changes under subgoal #2 we will not continue to subgoal #3 etc. concerning subgoal #4.

	Go	No-Go
Goal #1: Validation of behavioral paradigm	<p>Objective: get freeze-tuning curves for each mouse</p> <p>How: amending differences between stimuli</p> <p>Why: to get steeper or less steep tuning curves</p> <p>Pilot: stimulus difference will be determined in pilot expt in #10 mice</p>	If we do not get freeze tuning curves, i.e. constant freezing, no freezing or no declining freeze behaviour (approximate)
Goal #2: Determine structural connectivity	<p>Objective: neural network of serotonergic projections from DRN</p> <p>How: viral injection of tracer, only expressed in serotonergic neurons projecting from DRN to other brain regions</p>	If we do not obtain good expression patterns of our tracer emanating from DRN
Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation	<p>Objective: functional characteristics of serotonergic projections from DRN to the most promising target brain regions</p> <p>How: using optogenetic neuromodulatory techniques allowing serotonergic activation only of axons from DRN to other brain regions. Different subgoals exist to gradually home in on the function of these projections.</p> <p>Control: in each subgoal a subset of #10 mice will be injected with a are-independent virus, acting as sham-control injected animals</p>	We have 4 different subgoals that are serially interdependent. If we do not observe any behavioural effect of stimulating serotonin under subgoal #1 we will not proceed to subgoal #2. Idem for the next subgoals.

Table 2 | Schematic representation of go / no-go signals for each goal separately.

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	cfr. 1. Validation of behavioral paradigm
2	cfr. 2. Determine structural connectivity
3	cfr. 3. Optogenetic neuromodulation
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	<p>References</p> <p>Arruda-Carvalho M, Akers KG, Guskjolen A, Sakaguchi M, Josselyn SA, Frankland PW. Posttraining ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. <i>J Neurosci</i>. 2014;34(47):15793-15803.</p> <p>Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. <i>Science</i>. 2008;319(5870):1640-1642.</p> <p>Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. <i>Neuropsychopharmacol</i>. 2009;34(11):2376-2389.</p> <p>Cardin, J.A., et al. Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. <i>Nat Protoc</i>, 2010. 5(2): p. 247-54.</p> <p>de Hoz L, Nelken I. Frequency tuning in the behaving mouse: different bandwidth for discrimination and generalization. <i>PLoS One</i>. 2014;9(3):e91676.</p> <p>Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. <i>Biol Psychiat</i>. 2006;59(12):1136-1143.</p> <p>Honig WK, Urcuioli PJ. The legacy of Guttman and Kalisch (1956): Twenty-five years of research on stimulus generalization. <i>J Exp Anal Behav</i>. 1981;36(3):405-445.</p> <p>Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. <i>Physiol Rev</i>. 1992;72(1):165-229.</p> <p>Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. <i>Arch Gen Psychiat</i>. 1995;52(12):1048-1060.</p> <p>Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. <i>Nat Neurosci</i>. 2012;15(12):1613-1620.</p> <p>Lesch KP, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. <i>Neuron</i>. 2012;76(1):175-191.</p> <p>Letzkus JJ, Wolff SB, Meyer EM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A. A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. <i>Nature</i>. 2011;480(7377): 331-335.</p> <p>Liebe S, Hoerzer GM, Logothetis NK, Rainer G. Theta coupling between V4 and prefrontal cortex predicts visual short-term memory performance. <i>Nat Neurosci</i>. 2012;15(3):456-462.</p> <p>Lissek S, Bradford DE, Alvarez RP, Burton P, Espensen-Sturges T, Reynolds RC, Grillon C. Neural substrates of classically conditioned fear-generalization in humans: a parametric fMRI study. <i>Soc Cogn Affect Neurosci</i>. 2014;9(8):1134-1142.</p> <p>Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. <i>Nature</i>. 2012;484(7394):381-385.</p> <p>Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. <i>Neuron</i>. 2014;81(6): 1360-1374.</p> <p>McDevitt RA, Tiran-Cappello A, Shen H, Balderas I, Britt JP, Marino RA, Chung SL, Richie CT, Harvey BK, Bonci A. Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: differential participation in reward circuitry. <i>Cell Rep</i>. 2014;8(6):1857-1869.</p> <p>Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, Milad MR, Liberzon I. Biological studies of post-traumatic stress disorder. <i>Nat Rev Neurosci</i>. 2012;13(11):769-787.</p> <p>Pollak Dorocic I, Furth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlen M, Meletis K. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei.</p>

Neuron. 2014;83(3):663-678.

Priebe S, Bogic M, Ashcroft R, Franciskovic T, Galeazzi GM, Kucukalic A, Lecic-Tosevski D, Morina N, Popovski M, Roughon M, Schutzwahl M, Ajdukovic D. Soc Sci Med. 2010;71(12):2170-2177.

Raghanti MA, Stimpson CD, Marcinkiewicz JL, Erwin JM, Hof PR, Sherwood CC. Differences in cortical serotonergic innervation among humans, chimpanzees, and macaque monkeys: a comparative study. Cereb Cortex. 2008;18(3):584-597.

Redondo RL, Kim J, Arons AL, Ramirez S, Liu X, Tonegawa S. Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. Nature. 2014;513(7518):426-430.

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. Nature. 2011;472(7344):466-470.

Self M, Lorteije J, Vangeneugden J et al. (2014). Orientation-tuned surround suppression in mouse primary visual cortex. J Neurosci, 34:9290-9304.

Sherin JA, Nemeroff CB. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. Dial Clin Neurosci. 2011;13(3):263-278.

Tronel S, Belnoue L, Grosjean N, Revest JM, Piazza PV, Koehl M, Abrous DN. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. Hippocampus. 2012;22(2):292-298.

Vangeneugden J, Mazo C, Lepousez G. Fleeting memories: transient character of adult-generated olfactory granule cells committed to odour memories. Front Neurosci. 2015; doi:10.3389/fnins.2015.00110.

Vangeneugden J, Cohen MX, Lorteije J, van Beest E, Roelfsema P, Levelt C, Self M, Heimel A (2016). Surround suppression in mouse V1 depends on feedback from higher-visual areas. Nat Neurosci. Under review.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature. 2002;415(6875):1030-1034.

Wolff SB, Grunermann J, Tovote P, Krabbe S, Jacobson GA, Moeller C, Herry C, Ehrlich I, Friedrich RW, Letzkus JJ, Luthi A. Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. Nature. 2014;509(7501):453-458.

Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. Optogenetics in neural systems. Neuron. 2011;71(1):9-34.



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'.	35928	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University, Faculty of Health, Medicine & Life Sciences, Department of Neuropsychology and Psychiatry	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number #1	Type of animal procedure Goal #1: Validation of behavioral paradigm

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.

Primary outcome parameter

Develop and validate a new behavioral contextual fear conditioning task in mice allowing measurement of the level of generalization between similar but not identical auditory stimuli by measuring freezing response.

General design

The general goal of all experiments within this project proposal is to investigate the influence of serotonin in PTSD symptomatology. The underlying concept is that faulty pattern separation processes lay at the root of PTSD, due to an improper function of serotonin release. To test this theory we need a solid behavioral paradigm looking into pattern separation processes within the emotional domain. Surely this already exists within the cognitive domain with tasks such as the object recognition or object location tasks (van Hagen et al., 2014). Here, we will utilize auditory fear conditioning with freezing behavior as operant as a way to investigate pattern separation in the emotional domain. Freezing is a natural defense mechanism in prey animals, like mice, when threatened.

More concretely, we will associate tones of certain frequencies with one mild electric shock (duration: 1 sec, intensity: .6 mA), provided by an electric floor plate on which the mice are able to run freely. Based on previous studies (Letzkus et al., 2011; Wolff et al., 2014) one such pairing between tone and shock should suffice to produce significant freezing behavior. We are particularly interested in the amount of freezing to the other non-associated tones with different frequencies. This will allow us to make *freezing tuning curves*, i.e. measuring the amount of freezing to the other stimuli that differ objectively in varying

degrees from the original conditioned tone (see Figure 1). Optimal separation would predict that pure tones being highly similar (e.g. 12.5 kHz) to the shock-paired tone (e.g. 15 kHz) will not elicit freezing behavior. Depending on the initial results, the separation between tones can be adjusted, i.e. increments or decrements of 1, 2 or 3 kHz as being the most similar tones (e.g 15 kHz associated with a shock compared to 14 and 13 kHz or 13 and 11 kHz, etc.). The total dimension of the cage will be 20 x 20 cm, with a camera hanging over the cage to track locomotion. Existing soft- and hardware present in the institute will be utilized (Ethovision, Noldus Software).

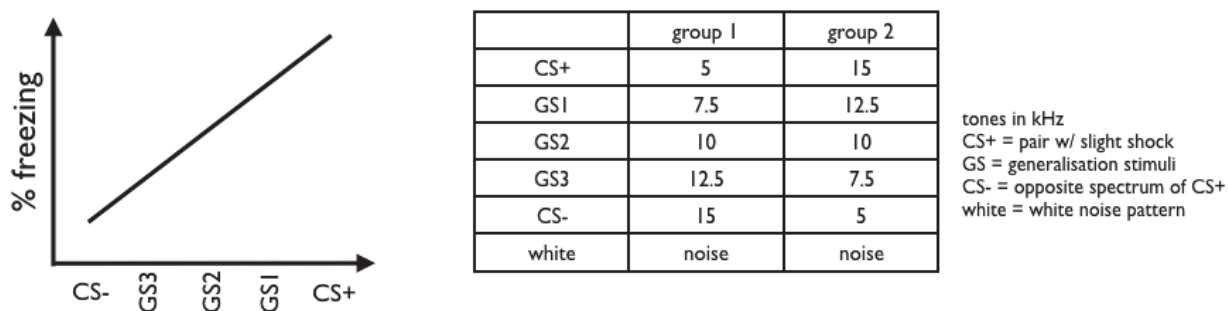


Figure 1 | Freezing tuning curve. Y-axis represents amount of freezing time in the retrieval phase to different auditory tones (X-axis). CS+ or conditioned stimulus is the tone associated with the electric shock. GS1-3 or generalization stimuli are tones similar to, but not identical with, the conditioned stimulus, but not associated with a shock. CS- or tone on the opposite spectrum is the tone most different in frequency from the paired tone. We will also present white noise to measure a general freezing state to sound per se, indifferent to the tones administered in our fear conditioning protocol.

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

This part of the project will consist of non-invasive behavioral monitoring of the locomotion of transgene ePet1Cre mice on a daily basis over a time course of maximally two weeks after auditory fear conditioning. We want to use a subgroup of these transgene mice (i.e. #20 mice) in order to also do structural connectivity mapping of serotonergic projections in the same mice, after finishing their behavioral training (Goal #2). The selection of these #20 mice will be done randomly.

Each animal will first be acquainted with being handled, i.e. taken out of the home cage and placed in the experimental set-up (20 x 20 cm box). Based on previous experiences with mouse behavioral tasks, performed at different national and international institutes, 1 week of daily handling will suffice for the mice to feel comfortable with being handled, i.e. taken out of the cage and put in the experimental set-up. We will use a small tube as a sort of 'elevator' to take the animals out of the cage in the most gently way. The handling phase is followed by placing the mice in the set-up for 30 minutes while tracking locomotion, again for one week. This will serve as a baseline measurement to benchmark further observations. Following these two weeks, the actual fear conditioning experiment will start.

Based on previous publications (Letzkus et al., 2011; Wolff et al., 2014), only one tone-shock association should be sufficient to elicit freezing behavior the next few days up to one week, even lasting up to a maximum of two weeks. Then extinction takes over and de-pairing/de-coupling will take place, gradually reducing the amount of freezing behavior. We are particularly interested in the generalization of freezing to other tones. After the initial fear conditioning session we will look at the extinction of these responses by monitoring the mice subsequently for two weeks, without administering electric shocks.

Mice that are not selected for the viral injection surgery (goal #2: Determine structural connectivity) will be euthanized according to ethical guidelines within our institution.

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

The total amount of 60 mice proposed here is based on previous fear conditioning studies (Letzkus et al., 2011), however no study up to now exists that utilizes exactly the same task. Our estimate is thus partly grounded by previous observations and partly speculative. We are thus unable to apply a specific statistic on the amount of mice necessary. Letzkus and colleagues (2011) needed a smaller amount of mice in their behavioral task because they were merely interested in the difference in amount of freezing behavior between two stimuli. They used auditory sweeps, a tone varying from low to high frequency versus another tone varying from high to low frequency. We are interested in documenting generalization in freezing to parametrically varying tones with less differences in-between than the sweeps used by Letzkus and colleagues (2011). Therefore we expect to use more mice, factor 3 compared to their study.

However, from previous auditory behavioral studies in mice we know that they have quite sensitive auditory thresholds (de Hoz & Nelken, 2014), thus being well suited for discriminating single tones. Furthermore, we will have full control over the parameters of the auditory stimulus, thus allowing us to increase the difference between tones, i.e. larger difference in frequency, should we notice based on the behavior from the first couple of mice that they show freezing behavior to 4 or more tones, i.e. pan-generalization. Pan-generalization would be suboptimal for us as it does not permit examining pattern separation processing per definition. Twenty randomly selected mice from these experiments will also be involved to examine our second research goal (*goal #2: Determine structural connectivity*).

B. The animals

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

We will employ transgene ePet1Cre mice (n = 60, males or females, aged 3-4 months), which are readily available at the institute. The cre-background in this mouse line has no effect on the phenotype and is considered safe to use, as has been done extensively by other researchers in this past, see e.g. Liu et al. (2014) and McDevitt et al. (2014). This amount of 60 mice is based on previous work by the group of a colleague in Switzerland (Letzkus et al., 2011). We will select young adults of a few months old (3-4 months) that will be housed in pairs for the whole duration of the experiment. Breeder mice will be acquired from a licensed breeder, while the breeding takes place in the transgene unit of our institution. This transgene mouse line will further provide mice for the next phases of the project too. Mice will be engaged only for 3-4 weeks once we start with the tone-shock pairing.

Total number of mice: #60

Strain: ePet1Cre, male + female

Age: 3-4 months

Specifics: Only behavioral assay, #20 mice will be re-used in Appendix #2

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.

Twenty mice will be selected for the structural connectivity analyses. This is justified as no further procedure is needed for these mice. After behavioral training, as proposed here in this Appendix 1, we will transcardially perfuse 20 mice and do post-mortem analysis on their brain slices.

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:

It's however not possible to perform these experiments in *lower class* animals. Mice have adequate hearing, also in this ePet1Cre mouse line (see eg. de Hoz & Nelken, 2014; Liu et al., 2014), to perform auditory experiments. Previous fear conditioning studies in the auditory domain have proven to be very successful in mice. It's also argued that results obtained in mice using fear conditioning protocols do extrapolate to humans. Furthermore our aim cannot be achieved by use of in vitro experiments or computer modelling, because these models do not allow for analysis of behavior and do not represent the organization of a complex neuronal network in a complex biological system such as the brain.

Reduction:

Based on previous published work (Letzkus et al., 2011) and personal communication with researchers from that laboratory we estimate to suffice with 60 mice for this task. In the study by Letzkus and colleagues they observed a 40% difference in 17 mice when looking at freezing behavior between an upward and downward auditory sweep (an in/de-creasing tone lasting 2 sec). The differences between our auditory stimuli are less salient hence more mice are needed. We will perform statistical analysis from the start of our observations. If we notice large differences between similar stimuli and hence high pattern separation, we will need fewer mice to achieve statistical significance, calculated using *Analysis of Variance* statistics. If we notice in the first five mice that differences between auditory stimuli are too small to be 'separated', i.e. mice show as much freezing to CS- and CS+, we will artificially increase stimulus difference, e.g. by selecting not 14 Hz but 12 Hz as CS- (with 15 Hz as CS+). Furthermore, 20 mice from the experiments in Appendix 1 will be re-used in the experiment in Appendix 2.

Refinement:

The level of the electric foot shock is inspired by previous published work in the field, but could be adapted (lowered) when excessive freezing is observed (e.g. 100% during the first 5 minutes of fear retrieval). Based on our contact with other institutes have experience with similar protocols this situation will be highly unlikely. All animals will be housed in pairs with same gender littermates, in order to minimize fighting and prevent unintentional breeding. Before starting our behavioral experiments we will first perform gentle handling on them to get them acquainted with the experimenters and the set-up.

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

The exposure to the mild electric shock will be limited to only one second for one day, without further repetitions. We do not expect the need to prolong this adverse effect. Furthermore social housing during the entire duration of the experiment reduces the stress of isolation. When mice, engaged in the experimental protocol and placed back in their home cage, show signs of pain, distress, infection or inflammation, they will be treated with analgesics, antibiotics and/or anti-inflammatory medications. We will prevent pain and discomfort by monitoring the animals during behavioral experiments. Behavioral testing will be conducted according to standard guidelines. Similarly, if animals show pain during any of the experimental procedures described, they will receive analgesics. The persons involved in this experiment possess a strong background of laboratory animal welfare experiences to minimize animal suffering, pain or fear.

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.

Not applicable.

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?

x No

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

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?

x 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.

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

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

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

When mice, engaged in the experimental protocol and placed back in their home cage, show signs of pain, distress, infection or inflammation, they will be treated with analgesics, antibiotics or anti-inflammatory medications.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be handled, i.e. acquainted to the experimental set-up, and will experience one session whereby one tone will be associated with a mild electric foot shock. This could all cause stress to the animal: being handled, taken out of its home cage, the electric shock and the post-shock testing following the pairing whereby psychological stress could play a part.

Explain why these effects may emerge.

Mice will probably also associate the context partly as a omen to the shock, although more tones without a shock association are present, in fact only .1% of tones presented will be associated with the mild electrical shock.

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

We only pair one tone for one second in one session with a mild electric shock. We will house them together and behavioral testing after the tone-shock association will only comprise a maximum of 30-60 minutes a day. Furthermore, handling of mice before the start of the behavioral experiments, to get them acquainted with the experimenter and the set-up, will further minimize severity.

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.

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

If mice present with freezing behavior > 30 min after the initial tone-shock association in their home

cage (only the presentation of one tone will be associated with a mild electric foot shock) they will be taken out of the experiment

Indicate the likely incidence.

< 1% with regard to the behavioral protocol, see Letzkus et al. (2011), a publication that resembles our work the most, indicates a same percentage of drop-out during fear conditioning.

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').

Behavioral protocol: mild -> low intensity electric shock (.6 mA) for just one second and only one day.

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.

Not all mice will be sacrificed: 20 mice will proceed to study goal #2 of the project (see *Determine structural connectivity*). For these mice we will need to do post-mortem histology and thus acquire the brains following euthanasia by an overdose of barbiturates and transcardial perfusion.

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



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'.	35928	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University, Faculty of Health, Medicine & Life Sciences, Department of Neuropsychology and Psychiatry	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number #2	Type of animal procedure Goal #2: Determine structural connectivity

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.

To get an idea on the specific anatomical serotonergic projections arising from the dorsal raphe nucleus (DRN) to other brain structures in the trained mice we will inject (see Goal #1) a fluorescent marker (AAV5.EF1a.DIO.hChr2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH) that will penetrate the somata in the DRN and travel along the axons projecting from this region. When injecting a Cre-dependent virus, such as this one, in the brain of a transgene mouse having Cre-recombinase expressed only in cells using serotonin as neurotransmitter, the fluorophore will only penetrate serotonergic somata and will only travel along these axons. Here we are interested in the anatomical spread of the fluorophore, to get the different projections from the DRN to other structures charted well.

Currently a substantial online database on structural connectivity exists (*The Mouse Allen Brain Atlas*, see <http://mouse.brain-map.org/>), but different proponents in the field advice on double-checking these published connectivity maps with own experiments. Moreover, the Atlas is not updated for the serotonergic system.

After allowing 2-3 weeks of viral expression we will perform transcardial perfusion and obduct the brain. Based on own experiences and that of numerous colleagues in the field applying viral injections, no side effects are expected. Fluorescence imaging of cut slices will instruct us on the anatomical connectivity between the DRN and other nodes of the serotonergic network. We will then match our slices with coronal sections of anatomical atlases. This will be done to determine, i.e. to name, the different brain regions that the DRN projects to. More specifically, we are interested in the regions of the brain that the dorsal raphe nucleus (DRN) projects to. This will be important information for us given that we want to

investigate the serotonergic network, which originates from the DRN.

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

A small selection of mice (n=20) will be randomly selected from the behavioral protocol (see Goal #1) and will be injected with a Cre-dependent fluorescent marker stereotactically in the DRN. The virus will be the same as under Appendix #3, with the difference here that no light stimulation is presented in-vivo.

Intracranial injections of the optogenetic opsin will be performed under general anesthesia and adequate post-surgery analgesia. After surgery, animals will receive two weeks of fully recovery in which they will obtain ad libitum water in the cage. After these two weeks, mice will be sacrificed, followed by transcardial perfusion. Post-mortem epi-fluorescence and confocal microscopy on the brain slices will reveal the most dominant projection areas of the serotonergic network.

All mice will be housed socially with same gender littermates for the whole duration of the experiment. They will be isolated for a few hours post-surgery to allow good recovery of the stitches used to close the scalp following viral injection, after which they will be re-paired.

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

By combining the first two goals of this project, we are able to reduce the amount of mice necessary, i.e. 60 mice in total for goals #1 (n = 60) and #2 (n = 20 of these 60 mice of Appendix 1) of the project.

B. The animals

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

We will only select transgene ePet1Cre mice, which are already available at our institute. The 20 selected mice (sex: males or females; age: 3-4 months) will first be subjected to the behavioral validation (Goal #1, see Appendix #1). Breeder mice are acquired commercially while the breeding takes place in the transgene unit of our institute. This transgene mouse line will further provide mice for the next goal (Goal #3) of the project too.

Total number of mice: #20

Strain: ePet1Cre, male + female

Age: 3-4 months

Specifics: re-use of mice from Appendix #1

Only targeted injections of ChR2 coupled to a fluorescent protein (eYFP = enhanced yellow fluorescent protein)

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.

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:

It's however not possible to perform these experiments in 'lower' class animals. As described in Appendix #1 mice have adequate hearing and the underlying neural network for hearing and fear conditioning is considered constructive when extrapolating results from mice to men (Yizhar et al., 2011). These aims cannot be achieved by use of in-vitro experiments or computer modelling, because these models do not allow for analysis of connectivity patterns and do not represent the organization of a complex neuronal network in a complex biological system such as the brain.

Reduction:

By combining two goals in the project we are able to reduce the amount of mice by 25%. After each mouse we will assess the quality of the histology and concatenate the results with the pooled results of the other mice. We will digitalize the data in order to easily created pooled connectivity maps. If we notice clear patterns arising when pooling the results from only a few mice, we will not continue with injecting more mice. Thus needing only a subset of the proposed 20 mice. Mice that will not be used for the structural mapping will be euthanized according to the protocol described under Goal #1.

The main applicant of this proposal has ample experience in histology and anatomy in mice, resulting from experience acquired at other institutes (Self et al., 2014; Vangeneugden et al., under review). By digitizing the data we will be able to construct a solid serotonergic database of connections arising from the DRN which we will disseminate in a separate methods paper to the neuroscience community. In this way other groups could take profit from our efforts and less mice are needed to be sacrificed for this purpose.

Refinement:

All animals will be housed socially with same gender littermates. Surgery performed on 20 mice will be according to good surgical practice with gas anesthesia during the procedure and analgesia up to two days after the surgery. The main applicant of this proposal has already ample experience in running structural connectivity studies and has recently published in high impact factor journals using this technique (Self et al., 2014; Vangeneugden et al., under review). Currently all the technological equipment is available at the institute to run these experiments. According to good practice we will also keep track of the behavior of the mice post-operatively, noting nutrition, fluids consumed, body weight and fur status.

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

These mice will not be subjected to the electric shocks anymore. They will only undergo a viral injection surgery with adequate peri-operative anesthesia and post-operative analgesia. After a few hours of isolation after surgery and 2-3 weeks of social housing we will sacrifice these mice and we will recuperate their brains for post-mortem histology. In addition, pre-operative, local anesthetic will be applied at the site of incision. If a mouse shows signs of pain, distress, infection or inflammation which cannot be treated using antibiotics or analgesics, the mouse will be eliminated from the experiment by means of euthanasia.

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.

Not applicable.

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.

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.

General anesthesia will be used for all surgical procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Standard analgesics will be applied to relief suffering during the post-surgical recovery period. We don't expect to apply any analgesics pre-operatively. During surgery, standard anesthesia protocols will be applied, which also relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We do not expect any signs of distress other than surgery and potential post-operative pain. Post-surgical infection will be treated with adequate medication.

Explain why these effects may emerge.

The viral injection involves opening the scalp and skull which might cause an infection of the skin, meninges or brain tissue. We will closely monitor signs of distress and handle accordingly and adequately with antibiotics or with sacrificing the animal if treatment is not adequate.

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. During the recovery period after surgery, mice will be inspected every day and body weight will be measured twice a week. Recovery boost gel will be administered if animals are not gaining weight. Prophylactic antibiotic will be administered. In case of adverse effects, the experiment will be halted and the animals will be treated accordingly.

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.

If post-surgery recovery develops slowly, i.e. mice still presenting with signs of distress (poor groomed skin, elephant arched back and minimal movement) a few days after surgery, euthanasia will be performed. We do not expect any effect on the serotonergic system given the fact that we only add a tracer to this neurotransmitter system and do not interfere with its normal functioning. We also do not expect brain infections to occur given surgery is performed under aseptic conditions and according to general guidelines from our institution.

Indicate the likely incidence.

< 1%, based on 4 years of experience by the principal researcher, performing similar procedures at other national and international institutes, with regard to the surgeries.

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').

Viral injection surgery is considered as moderate level of discomfort. Therefore adequate anesthesia and extensive analgesia will be used during and after surgery.

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.

For 20 mice we need to do post-mortem histology and thus acquire the brains following euthanasia by an overdose of barbiturates and transcardial perfusion.

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



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'.	35928	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University, Faculty of Health, Medicine & Life Sciences, Department of Neuropsychology and Psychiatry	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number #3	Type of animal procedure Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation

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.

Having validated our behavioural assay under Goal #1 (see Appendix #1: 'Validation of behavioral paradigm') and having established the structural connectivity under Goal #2 (Appendix #2: 'Determine structural connectivity') we will now inject light-sensitive opsins into the dorsal raphe nucleus (DRN) of the transgene ePet1Cre mouse line. This technique, known as optogenetics, will allow us to examine the behavioural effects and relevance on behaviour of activating the serotonergic system in the mouse model of PTSD.

More concretely this is achieved by injecting a Cre-dependent viral construct. Within such a system the virus will only be expressed in cells carrying Cre-recombinase. Using Cre-dependent channelrhodopsin (ChR2), a light-gated opsin, activation by blue light (473 nm), allows for influx of Na⁺ ions into the cells causing depolarization thus excitation of these cells. The following viral construct will be used for excitation: AAV5.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH, a Cre-dependent construct and AAV5.CaMKIIa.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH, a Cre-independent construct. The major advantage of optogenetics is the ability to target not only certain cell types, but to also have millisecond control over the activity of the transfected cells in a transistor on/off type fashion using photons. Once the virus is replicating on the cell membrane at the soma, it will also start to replicate along the whole axonal projections from these specific cells to other regions. By implanting a tiny light fiber (200 um) above the DRN proper and above the projection areas, we will be able to activate the full serotonergic system (DRN proper stimulation at the somata), or only specific end terminals of the serotonergic network, e.g. the

DRN-to-DG (dentate gyrus) projection pathway.

We are primarily interested in observing changes in behavioural outcome with respect to amount of freezing when subjecting the mice to the paradigm of Appendix #1. We hypothesise to observe freezing to fewer auditory tones resembling the aversively conditioned tone when increasing serotonin release. This is in line with the faulty pattern separation process, restored partially by artificially increasing serotonin. As such mice will become better at discriminating two tones of different frequency.

An example is used to clarify this point, see also Figure 1. If a mouse shows 80% freezing to a tone of 15 kHz (CS+ or the conditioned stimulus, i.e. paired once with a mild electric foot shock) it will also show freezing, of lesser extent, to the neighbouring tone of 12.5 kHz (GS1 or generalization stimulus), e.g. 50%, and even less freezing to 10 kHz (GS2), e.g. 20% and no more freezing to e.g. 7.5 kHz (CS- or the stimulus on opposite pattern) (see black line in graph of Fig. 1). This over-generalization of freezing can be explained in terms of faulty pattern separation processes. By increasing serotonin release during retrieval (see blue line in graph of Fig. 1) we expect to find less over-generalization, i.e. still considerable freezing to the conditioned stimulus, e.g. 70-80% to 15 kHz, but less freezing to similar stimuli, e.g. 20% to 12.5 kHz and no freezing to the 10 kHz tone.

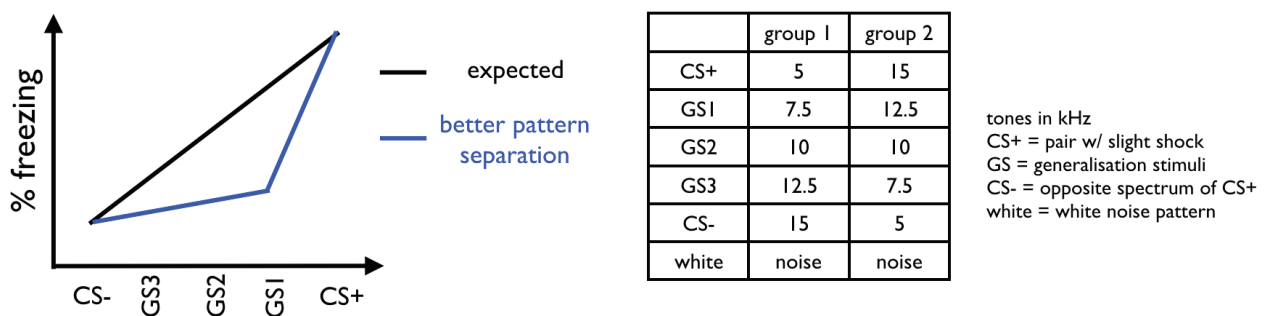


Figure 1. Potential behavioural outcome from the optogenetic experiment. Left panel shows the amount of freezing behaviour to different stimuli. The CS+ is the conditioned tone paired with the slight electric shock. GS1-3 are termed generalization stimuli and are tones of a different frequency not paired with the shock. CS- is the tone totally opposite of the spectrum, i.e. the most different tone. Black curve depicts the expected behavioural outcome without optogenetic stimulation of the serotonergic system. Blue curve depicts the expected outcome after increasing serotonin release. Right panel: table depicting different groups created by counterbalancing conditioning of stimuli. In group 1 the tone paired once with the shock will be the 5 kHz tone. We are interested in the generalization of freezing to the other tone. Group 2 will have the 15 kHz tone associated with the electric foot shock.

We will also perform electrophysiological recordings using optrodes (recording probe + light fiber) during the behavioural paradigms to get an idea on the amount of manipulation and the neural signature underlying the abovementioned potential behavioural change.

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

Following an acclimatization period where ePet1Cre mice are being handled and placed in the experimental set-up, we will proceed with targeted viral injections of the opsins in the DRN (see also Appendix #2). Handling and acclimatization will proceed according to the protocol described in Appendix 1. Also surgery, post-surgery pain relief and general health monitoring will follow exactly the same guidelines as described in Appendix 2, with the exception that now, micro light fibers will be implanted intracranially and fixed on top of the cranium using dental cement. It is important that we implant these fibers bilaterally as our goal is to either completely upregulate serotonin release, in a first approach only over DRN, while in a later approach also over the specific projection areas. We do not expect to observe any pre-operative signs of pain or distress. During surgery we will utilize adequate anesthetics.

All micro-fiber implantations will be bilateral and all virus injections will be with commercially available vectors in transgene ePet1Cre mice. After each surgery, the mice are isolated a few hours to maximally 12 hours, followed by 2 weeks of full recovery and viral expression. For the whole duration of the project mice are socially housed with same gender littermates.

Table 1 gives the reader a quick overview on the experiments proposed within this Appendix 3.

	Short description	Mice	Extra information
<p>Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation</p>	<p>Using optogenetic neuromodulation to selectively increase serotonin release, separately for the different target projection areas (dentate gyrus - DG, prefrontal cortex (PFC) and primary auditory cortex (A1)), and observe effect on freezing tuning curves.</p>	<p># 220 males + females ePet1Cre line</p>	<p>All experiments: Cre-dependent viral vector Chr2 + #10 sham-injections Cre-independent virus</p> <p>Subgoal #1: General excitation of neural activity in DRN using pan-neural promotor (CaMKII) in #40 mice. [#30 actual experiment + #10 pilot]</p> <p>Subgoal #2: General excitation of serotonin neurons in DRN using Cre-dependent promotor (EF1.DIO) with light fiber stimulation over DRN in #70 mice, during acquisition phase, retrieval phase or both phases [#20 acquisition, #20 retrieval, #20 both, #10 control]</p> <p>Subgoal #3: Target specific excitation of serotonin neurons separately for DRN-DG, DRN-PFC and DRN-A1 projections, in #20 mice each. Similar as subgoal #2 but now placement of light fiber over different target areas. [#70 mice in total]</p> <p>Subgoal #4: Electrophysiological recording from target area with the most promising behavioral outcome, i.e. largest effect on freezing tuning curve. [#40 mice in total].</p>

Table 1 | Overview of the different subgoals and mice needed for each experiment within this Appendix 3.

(1) Subgoals #1-#2-#3: Optogenetic neuromodulation: behavior

For the optogenetic experiments we will first focus on investigating the effect of general excitation of the DRN by injecting Chr2-CaMKII virus, which expresses in all excitatory cells. This will be achieved in #40 ePet1Cre mice and will give us a rough overall idea of the total involvement of the DRN in the behavior when using optogenetics. The number of mice needed for this first subgoal is inspired by a similar study by another group (see Letzkus et al., 2011), where #20 mice were utilized in their behavioral protocols. We do add a surplus of #10 mice given that these experiments will be the first optogenetic experiments carried out at our institute and another #10 mice with sham-injections of a cre-independent virus that will function as a control condition.

Next we will focus on the upregulation of serotonin by injecting cre-dependent Chr2 in the DRN of #60 ePet1Cre mice, together with another #10 sham-injected mice (see above). We will first implant optical micro-fibers over the DRN in these mice and run them through the behavioral assay (see Appendix #1). All mice will receive serotonin upregulation during the retrieval phase only. We speculate based on previous research (Kheirbek et al., 2012; Liu et al., 2012) that manipulating the serotonergic system within the retrieval phase could yield differences in the behavioral outcome as explained above. We request #60 mice given that here we would like to test the difference between activating/upregulating serotonin release during the acquisition phase, i.e. when the electric shock is first paired with the auditory tone, versus the retrieval phase, i.e. when the paired tone – but this time without an electric shock – is presented again. As such, #20 mice will be tested whilst manipulating serotonin during acquisition, #20 mice whilst retrieval and another #20 mice will be tested during acquisition and retrieval.

To disentangle the functional involvement of the different projections from the DRN to different target regions, we will again virally inject the DRN, but this time we will not only implant fibers over the DRN, but also over the dentate gyrus (DG), prefrontal cortex (PFC) and primary auditory cortex (A1), each time in #20 mice, amounting to a total of #60 mice under this procedure, combined with another #10 sham-injected control mice (see above). In these mice, only one viral injection is necessitated, only in DRN. Due to viral spread via axons, Chr2 will also reach all the projection areas. To stimulate serotonin release specifically in these projection areas, we will need to get the light stimulation on those spots. This can only be achieved by implanting light fibers specifically over those projection areas. Depending on the results of subgoal #2 we will stimulate the different projections of DRN during the acquisition phase, retrieval phase or both phases.

In summary, for all behavioral subgoals we will be needing #20 mice per condition. Each mouse will be compared as a within factor, i.e. comparing stimulation on vs off.

(2) Subgoal #4: Optogenetic neuromodulation: electrophysiology

Electrophysiological recordings will be made while mice are engaging in the task and will serve as (a) a validation method to show the effectiveness of the viral manipulation and (b) an indication of the response characteristics of the serotonergic cells. We will insert optrodes (multi-contact arrays with an optic fiber attached, commercial system available from e.g. Neuronexus Inc.) over the DRN and the most promising projection area, based on the analyses of the behavioral tests. We will do this for 30 mice and another #10 sham-injected control animals (see above). It is not possible to 'recuperate' these mice from the behavioral optogenetic interventions because the dental cement on top of the skull is not easily removable. We will implant optrodes in one surgery together with the viral injection, adhering to the abovementioned anesthesia-analgesia protocol. The optrodes can be left within the cortex using a connector piece outside the skull allowing multiple recordings over multiple days. Once the optrodes are implanted the cranium will be closed again completely, i.e. no craniotomies have to be made for our recordings over multiple days. We will record for 3 consecutive days after fear conditioning.

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

By approaching these optogenetic neuromodulation experiments step by step whilst determining the most optimal conditions, we minimize the number of mice needed. The different steps suggest go/no-go decisions, i.e. if subgoal #1 comes out negative we do not proceed to the following subgoal and so forth. We will first try-out a general aim by general excitation of the DRN, independent of its projections. Then we gradually home in on more specific subpopulations: serotonergic cells within the DRN and their projections to the different relevant brain regions based on extensive literature survey beforehand, to finally arrive at the most promising DRN-target brain region where we will record the neural signature of the accompanying behavioural modification. Our goal of a minimum of 20 mice per condition with each sub-experiment is inspired by an influential study published by a collaborative group (Letzkus et al., 2011).

B. The animals

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

We will only use ePet1Cre mice, #180 mice for the behavioural testing of the optogenetic modulation (#40 mice in subgoal #1, #70 mice in subgoal #2, #70 mice in subgoal #3) and #40 mice will be used for the simultaneous electrophysiological recordings combined with optogenetic modulation during the behavioural assay.

All mice will be around 2-3 months old when we will start handling them. They will be around 12 weeks old at the moment of surgery and 14 weeks old at the moment of the behavioural testing and optogenetic manipulation. We will make no difference between males or females. All mice will be socially housed together with same gender littermates.

Total number of mice: #220

Strain: ePet1Cre

Age: 2-4 months

Behavioural assay + optogenetic stimulation

1. #30 mice – general neural promotor CaMKII & #10 sham-injected mice
2. #60 mice – Chr2 in DRN + light fiber over DRN & #10 sham-injected mice
3. #60 mice – Chr2 in DRN + light fiber over DG, PFC or A1 & #10 sham-injected mice

Behavioural assay + optogenetic stimulation + electrophysiological recording

4. #30 mice – Chr2 in DRN + light fiber over area with best behavioural effect (DG, PFC or A1) & #10 sham-injected 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.

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:

It's however not possible to perform these experiments in 'lower' class animals. Mice have adequate hearing to perform auditory experiments and previous fear conditioning studies have proven to be very successful in mice (see eg. de Hoz & Nelken, 2014; Liu et al., 2014). It's also argued that results obtained in mice using fear conditioning protocols do extrapolate to humans. Furthermore the cell-type specific manipulations proposed here using optogenetics are only applicable in transgene mouse lines. Furthermore these aims cannot be achieved by use of in-vitro experiments or computer modelling, because these models do not allow for analysis of behavior and do not represent the organization of a complex neuronal network in a complex biological system such as the brain.

Reduction:

The experience gained by the primary applicant at different national and international institutes as a post-doctoral researcher applying similar protocols and paradigms, albeit in a different sensory system (visual system), will ensure minimal drop-out of mice during both the surgeries and experiments. We will limit the number of animals in this study to a minimum by using power analyses. The power analyses are based on our primary outcome measure: behavioral improvement due to optogenetic neuromodulation. We will make use of the knowledge in similar behavioral protocols using optogenetic neuromodulation from other high-end laboratories, by means of close collaboration with these groups.

Refinement:

The level of the electric foot shock is inspired by previous published work in the field, but could be adapted (lowered) when excessive freezing is observed (e.g. 100% during the first 5 minutes of fear retrieval). All animals will be housed socially with same gender littermates and the surgery performed will be according to good surgical practice with gas anesthesia during the procedure and analgesia up to two days after the surgery. By choosing the mouse as our preferred animal model, exhibiting similar PTSD-like behavior as in humans, with behavioral tests alike the one presented here already validated, will result in data that can be extrapolated to human patients. Additionally, we have put extra efforts to design the experiment as such that it causes minimal distress to the animals. In particular, the best and most up to date surgical procedures, light fiber construct, drug administration methods and behavioral test are planned. Moreover, we know from our own previous unpublished study which readout measures are more representative and useful. For instance, following observation of certain behavioral phenotype

(freezing), what sort of analysis should be conducted. Having this experience will most likely shorten the duration of the experiments.

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

The exposure to a mild electric shock will be limited to only one second for one day. Furthermore social housing during the entire duration of the experiment reduces the stress of isolation. Social housing is also maintained for the mice that will be operated upon.

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.

Not applicable.

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.

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.

General anesthesia will be used for surgical procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Standard analgesics will be applied to relief suffering during the post-surgical recovery period. We don't expect to apply any analgesics pre-operatively. During surgery standard anesthesia protocols will be applied, which also relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

A possible adverse effect which might occur is loss of an implanted construct. Also the short-term depletion of serotonin after the experiment due to overuse of serotonin release during the experiment could have an effect on the emotional well-being of the mice. Given the fact that we will only upregulate serotonin for the duration of the behavioral assay, estimated to last approximately 30-60 min/day, we do not expect to resort big effects on long-term serotonin levels.

We will closely watch the mouse's status during the whole experiment, but also specifically post-experiment. We will document its weight, its cage behavior, its grooming status, its interaction with the other mouse in their cage etc. Viral tools used in this study are not infectious (Cardin et al., 2010; Gradinary et al., 2009). The viral tools are applied locally in very small quantity. Thus, do not induce any immune reaction nor has apoptosis or neural cell damage been reported (for review see e.g. Yizhar et al., 2011).

Explain why these effects may emerge.

The fiber construct is fixed on the skull of the animal using dental cement. In the post-operative period the head skin of the animal will heal and grow around the construct. However infection may still occur. Special care will be taken for mice after being engaged in the experiment. However, due to potential lack of serotonergic neurotransmission, some animals might become more anhedonic and hence loose appetite. Based on previous studies using similar optogenetic excitation of serotonin, this outcome is considered unlikely, < 1% (Liu et al, 2014; McDevitt et al., 2014).

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. During recovery period after surgery, mice will be inspected several times a day and body weight will be measured every day. Recovery boost gel will be administered if animals are not gaining weight. Prophylactic antibiotic will be administered. In case of adverse effects, the experiment will be halted and the animals will be treated accordingly.

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.

If mice present with freezing behavior > 30 min after the initial tone-shock association in their home cage (only the presentation of one tone will be associated with a mild electric foot shock) they will be taken out of the experiment. Based on previous experiments with optogenetic experiments and viral injections in mice we expect no additional stress, on top of the stress of the surgeries. As mentioned before, the temporary serotonin depletion after interval stimulation between 30 – 60 minutes per day, will mostly likely not resort any effects on the behavior of the mouse. Nevertheless, they will be closely monitored to prevent the effects of such depletion.

Indicate the likely incidence.

< 1%, based on 4 years of experience by the researcher at different national and international institutes, performing similar procedures, with regard to the surgeries, optogenetic neuromodulation and behavioral protocol will help us performing these procedures to the best of our ability and knowledge.

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').

Behavioral protocol: mild -> low intensity electric shock (.6 mA) for just one second and one presentation during the first tone-shock association session.

Surgery for implantation of the micro light fibers and viral vector delivery to the DRN: moderate -> adequate peri- and post-surgery anesthesia and analgesia will be provided. All operations will be performed under anesthesia. The expected effect of temporary serotonin depletion will be minimal given only the restricted duration of the experiments. We do not expect pain or distress before surgery and after surgery, when necessary based on the status of the animal, we will provide adequate analgesia and/or antibiotics. The cumulative discomfort will therefore be considered moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To verify the extent of labelling serotonergic cells and their projection pathways with our light-gated opsins, we need to perform post-mortem histological analyses on each of the mice tested in our behavioural assay. The lack of a functional effect could be due to under-expression of our artificial ligands. Also, as we are interested in activating only the serotonergic neurotransmitter system we would like to avoid labelling and hence artificially exciting/inhibiting non-serotonergic pathways.

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.

x Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002017825

Bijlagen

2

Datum 17 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 januari 2017. Het gaat om uw project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002017825. 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:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017825

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
17 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017825

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 1 maart 2022
Titel project: The role of serotonin in post-traumatic stress disorder
Titel niet-technische samenvatting: Het belang van de neurotransmitter serotonine bij posttraumatische stress stoornis (PTSS)
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD, Maastricht
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Maastricht
Datum: 16 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002017825

Bijlagen

2

Datum 17 januari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 januari 2017

Vervaldatum: 16 februari 2017

Factuurnummer: 170825

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017825	€ 1.541,00

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

DEC-advies PV 2015-004/ [REDACTED]

Preambule:

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *The role of serotonin in post-traumatic stress disorder.*
3. **Titel van de NTS:** *Het belang van de neurotransmitter serotonine bij posttraumatische stress stoornis (PTSS).*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe** aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC; *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC-UM 17-11-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 25-11-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
 - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 17-11-2016*
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum 29-11-2016
 - Gestelde vragen:

3.1 Achtergrond

Vragen:

1. *Het voorbeeld van de geur van een BBQ (hetgeen doet denken aan brandend mensenvlees) roept enkele vragen op: 1. Is de geur niet (vrijwel) identiek (m.a.w. dezelfde stimulus) en is er dan wel sprake van faulty PS? Het lijkt eerder de context/associatie die dan anders is. Dit is wezenlijk anders dan wat er in het geplande project wordt bekeken (verschillende stimuli).*

2. *Is het probleem bij PTSD wel faulty PS of is het wellicht juist het gebrek aan top-down cognitieve controle van emoties die vergelijkbare stimuli oproepen? Dat de geur van de BBQ aan het brandende mensenvlees doet denken is niet zo vreemd. En het zou zelfs zo kunnen zijn dat PTSD patiënten en controles verschillende stimuli perfect zouden kunnen onderscheiden, terwijl hun respons toch wezenlijk verschillend is. Het lijkt dan eerder relevant of men de daarbij opkomende emoties juist kan plaatsen en/of onderdrukken. Wat dat betreft zou het niet verwonderlijk zijn wanneer binnen dit project serotonerge input naar bijvoorbeeld de PFC (zoals voorgesteld) juist deze top-down cognitieve control zou beïnvloeden. Dit lijkt dan PS te beïnvloeden (reduced freezing), maar feitelijk kijk je naar iets anders. Hoe wil men hiervoor corrigeren?*

Antwoord Ad 1.

De achterliggende hypothese in deze proeven is het bestuderen van overgeneralisatie, veralgemening zo u wil, van vrees aan de hand van de stimulus generalisatie taak die reeds uitgebreid gebruikt en gevalideerd is in humane studies, zie o.a. Lissek et al. (2010), Lau et al. (2011), Lissek et al. (2014a en 2014b). Het aangehaalde voorbeeld komt rechtstreeks uit een review paper in Nature Neuroscience (Kheirbek et al., 2012, zie Figuur 1 uit hun paper). Post-traumatische stress stoornissen hangen deels samen met foutieve contextuele attributie zoals terecht opgemerkt door DEC-UM (stimulus A: geur verbrand *mensenvlees* in context A: oorlog vs stimulus A: geur verbrand *dieren*vlees in context B: BBQ), maar omdat de context waarin een stimulus verschijnt ook beschouwd kan worden als een kenmerk, ook met het overgeneraliseren van aangeleerde vrees naar andere situaties. Zo zullen gelijkende stimuli die een aantal kenmerken delen met de geconditioneerde stimulus, zoals de geur van de BBQ in combinatie met de hitte en geluid van het open vuur in buitenlucht en niet zozeer de geur van aangebrande aardappelen op een inductiekookplaat binnenshuis slechts de geconditioneerde respons kunnen ontlokken. Als deze twee situaties bekeken worden als een verzameling van kenmerken dan is er bepaalde mate van overlap die te maken heeft met de stimulus an sich, alle sensorische componenten (geur, geluid, gevoel etc.), maar ook met componenten die de stimulus overstijgen, zoals de context waarin die stimulus vervat zit (o.a. buiten- vs binnenlucht). In een ideale wereld zou je beide componenten (stimulus an sich en context) willen onderzoeken. We hebben in het bestek van dit project gekozen te gaan voor de eerste component, in navolging van de reeds gevalideerde paradigma's in humane studie. Deze component leent zich heel goed tot experimentele manipulatie, wat niet zozeer een vergoelijking is voor de keuze, maar wel een eerste handvat geeft in ons onderzoek naar de neurale basis van een ingewikkeld ziektebeeld zoals dat het geval is bij PTSS.

Referenties

- Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. (2012). Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci*;15:1613-1620.
- Lau JY, Britton JC, Nelson EE, Angold A, Ernst M, Goldwin M, Grillon C, Leibenluft E, Lissek S, Norcross M, Shiffrin N, Pine DS. (2011). Distinct neural signatures of threat learning in adolescents and adults. *Proc Natl Acad Sci USA*;108:4500-4505.
- Lissek S, Rabin S, Heller RE, Lukenbaugh D, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2010). Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *Am J Psychiatry*.167:47-55.
- Lissek S, Bradford DE, Alvarez RP, Burton P, Espensen-Sturges T, Reynolds RC, Grillon C. (2014a). Neural substrates of classically conditioned fear- generalization in humans: a parametric fMRI study. *Soc Cogn Affect Neurosci*;9:1134-1142.
- Lissek S, Kaczkurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2014b). Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biol Psychiatry*;75:909-915.

Antwoord Ad 2.

Top-down/cognitieve regulatie van emoties/emotionele gedragspatronen vanuit de prefrontale cortex naar de basolaterale amygdala zoals door de DEC-UM voorgesteld is inderdaad een heel valabel mechanisme wat betreft vrees-conditionering waar de laatste jaren heel wat onderzoek naar verricht is, zie o.a. Courtin et al. (2014) en Knapska et al. (2012). Ook in dit onderzoeksvoorstel nemen we deze belangrijke projectiebaan onder de loep (zie vb. subgoal #3 -DRN-PFC projecties - van goal #3 - Functionele Connectiviteit), maar dan voornamelijk vanuit de vraag naar het belang van serotonine op dit top-down regulatie mechanisme. Aan de hand van goal #2 – Structurele Connectiviteit – willen we eerst een beter zicht krijgen op het belangrijkste subgebied in de prefrontale cortex van serotonerge projecties. Door deze projecties dan selectief uit te schakelen middels optogenetische technieken, kunnen we nagaan wat door de DEC-UM correct wordt opgemerkt, m.n. “*dat* serotonerge input naar bijvoorbeeld de PFC (zoals voorgesteld) juist deze top-down cognitieve control zou beïnvloeden”. Het effect op vrees-conditionering bij manipulatie van de DRN-PFC projectie, gemeten via overgeneralisatie in onze stimulus generalisatie taak, kan verder afgetoetst worden aan het effect gemeten bij manipulatie van de andere projectiebanen, zoals DRN-DG en DRN-A1. Welke van deze projectiebanen het belangrijkste zal zijn, zal moeten blijken uit de empirie.

Referenties

Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton J, Bienvenu TC, Herry C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*; **505**:92- 96.

Knapska E, Macias M, Mikosz M, Nowak A, Owczarek D, Wawrzyniak M, Pieprzyk M, Cymerman IA, Werka T, Sheng M, Maren S, Jaworski J, Kaczmarek L. (2012). Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. *Proc Natl Acad Sci USA*; **109**:17093-17098.

2. *Wordt er ook gecorrigeerd voor pattern completion (PC)? Ook dit wordt binnen de huidige experimentele setup niet losgekoppeld van PS.*

Antwoord:

Doordat PS en PC beschouwd dienen te worden als twee componenten op een continue schaal eerder dan twee afzonderlijke en discrete componenten, omvat de studie van de ene per definitie ook de studie van de andere. Vertrekkende van een gelijkaardige beginsituatie van twee stimuli/contexten (zie vorige redenering) houdt PS in dat de schematische representatie (vb. DRN-PFC projecties) de twee stimuli/contexten beter onderscheidt, als het ware zorgt voor minder overlapping. Anderzijds kan het evengoed zijn dat het verstoren van deze projecties via optogenetische neuromodulatie er net voor zorgt dat beide stimuli/contexten schematisch net meer op elkaar gaan gelijken, en er bijgevolg sprake is van PC. Door de parametrische stimulus manipulaties zoals we ze hier geoperationaliseerd hebben, kunnen we de effecten, PS vs PC, ten gevolge van de specifieke manipulatie van projectiebanen experimenteel controleren.

3. *Niet iedere persoon die blootgesteld wordt aan trauma, ontwikkelt PTSD. Wordt hier (differential susceptibility) binnen de context van de geplande muizenstudies ook naar gekeken?*

Antwoord:

Nee, hier wordt in het bestek van dit project niet naar gekeken.

4. *De DEC-UM wil graag een meer onderbouwde achtergrond over de beschikbaarheid van en de beschreven resultaten met proefdieren (bijv. de ePet1Cre transgene muis) in kader van PTSD en het serotonerge systeem om de beschreven hypothese te staven.*

Antwoord:

Het gebruik van de ePet1Cre transgene muis in de context van PS/PC is innovatief waardoor er geen resultaten over dit soort proeven voorhanden is. Wel is de muislijn gebruikt geweest in studies die onderzoek deden naar gedrag gerelateerd aan beloning (Liu et al., 2014), geduld voor toekomstige beloningen (Miyazaki et al. 2014) en sociale contacten (Matthews et al., 2016). De eerste studie (Liu et al., 2014) verdient verdere verduidelijking. Zij vonden namelijk dat het stimuleren van serotonine vrijgave in de DRN leidde tot meer plaats-preferentie, het verkiezen van een stimulus gekoppeld aan serotonine vrijgave boven een suiker beloning, maar tevens ook tot het beter kunnen discrimineren van sensorische stimuli. Zij gebruikten een olfactorische taak waarbij de muis twee geuren van elkaar diende te onderscheiden. Het optogenetisch activeren van de serotonerge neuronnen in de DRN leidde tot steilere leercurves. De olfactorische taak was een van de vele taken in hun onderzoek en PTSS lag nooit in hun vizier. Dit was voor ons een belangrijk aanknopingspunt voor dit onderzoeksvoorstel.

Referenties

Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M. (2014). Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*;81:1360-1374.
Matthews GA, Nieh EH, Vander Weele CM, Halbert SA, Pradhan RV, Yosafat AS, Glober GF, Izadmehr EM, Thomas RE, Lacy GD, Wildes CP, Ungless MA, Tye KM. (2016). Dorsal raphe dopamine neurons represent the experience of social isolation. *Cell*;164:617-631.
Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, Takahashi A, Tabuchi S, Doya K. (2014). Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr Biol*;24:2033-2040.

5. *De DEC-UM vraagt zich af wat de plaats van de voorgestelde studie is binnen de huidige behandelmethodes? Het is nu moeilijk te beoordelen in hoeverre Uw idee vernieuwend en van toegevoegde waarde is.*

Antwoord:

Het onderzoeksvoorstel heeft bovenal een fundamenteel wetenschappelijke inslag. We beogen geen directe klinische implicaties met onze onderzoeksresultaten. Wel is het zo dat een humane studie aantoonde dat de reconsolidatie van vreesherinneringen kan bespoedigd worden na gebruik van een standaard beta-blocker (Kindt et al, 2009). Onze bevindingen zouden op termijn eventueel kunnen zorgen voor het gebruik van antidepressiva die de vrijgave van serotonine kunnen beïnvloeden tijdens reconsolidatie therapie bij PTSS of andere angststoornissen.

3.2 Doel

Vragen:

1. *Goal #2. Is het voor een eerste exploratieve studie (zoals beschreven bij Goal #3) niet afdoende af te gaan op serotonerge connecties die reeds beschreven zijn? De beschreven experimenten bij Goal #2 lijken zo niet kritisch voor Goal #3.*

Antwoord:

Nee, uitgaan van reeds beschreven studies is niet afdoende. De volgende argumenten gelden tegen de objectie van de DEC-UM:

(1) Voorgaande structurele connectiviteit studies beschikten nog niet over de transgene serotonine muislijn en waren derhalve afhankelijk van immunohistochemische methoden.

Door gebruik te maken van de ePet1Cre muislijn in combinatie met 3D-reconstructie technieken gebaseerd op fluorescentie beeldvorming zullen we in staat zijn een uitgebreid 3D-model te reconstrueren door injectie van een Cre-afhankelijke marker. Dit in navolging van de studie van Pollak Dorocic en collega's (2014) waarbij gekeken werd naar de input vanuit verschillende hersengebieden naar de DRN. (2) Een bestaande database, m.n. de Allen Mouse Brain Atlas, is nog niet uitgebreid met de serotonerge projecties vanuit de DRN. (3) Het doel achter onze optogenetische neuromodulatie experimenten is na te gaan welk effect serotonine heeft op vrees-conditionering door de serotonerge projecties vanuit de DRN naar andere hersengebieden te beïnvloeden en het effect hiervan op gedrag te observeren. Vrees-conditionering omvat tal van hersengebieden (Herry & Johansen, 2014) en het is nog niet exact geweten hoe serotonine hierop inwerkt, m.a.w. via welke structuren het inwerkt op dit neurale circuit.

Referenties

Herry C & Johansen JP. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat Neurosci*;17:1644-1654.

Pollak Dorocic I, Furth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlen M, Meletis K. (2014). A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron*;83:663-678.

2. *De DEC-UM vraagt om duidelijker in de tekst te vermelden dat doel 2 gebruikt maakt van dieren al beschreven in doel 1. Nu blijkt dit enkel uit de bijgevoegde tabel.*

Antwoord:

Dit wordt nu duidelijk(er) vermeld in de tekst.

3. *De DEC-UM merkt op dat het doel van dit PV is onderverdeeld in drie specifieke aims, en dat er een "interdependence" tussen deze verschillende aims is. Hoe gaan de onderzoekers het PV uitvoeren als aim 1 of 2 niet succesvol blijken?*

Antwoord:

Dit is een zeer terechte opmerking van het DEC-UM. We hebben ook heel lang gepuzzeld en gebrainstormd over hoe het best invulling geven aan de nieuwe regelgeving waarbij een 5-jaren plan uitgekend dient te worden. In dergelijk tijdsbestek kan je als onderzoeker ook niet anders dan een aantal experimenten serieel te plannen waarbij er noodzakelijkerwijs interdependentie optreedt. We hebben ervoor geopteerd de interdependentie te minimaliseren door 3 grote doelen voorop te stellen, m.n. een gedragscomponent, een anatomische component en een functionele component, overeenkomend met *Goal #1 Validation of behavioral paradigm*, *Goal #2 Determine structural connectivity* en *Goal #3 Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation*, respectievelijk. Binnen goal #3 hebben we dan nogmaals een onderverdeling gemaakt in subgoals, dit omwille van dezelfde redenering. Er is dus deel serialiteit/interdependentie, maar tevens ook onafhankelijkheid van de voorgestelde experimenten. Ieder experiment heeft tevens ook voldoende 'buffers' om de keten niet te verstoren.

Zo kunnen we onder goal #1 de gedragstaak voldoende goed afstellen, zorgen voor voldoende discriminatie in vriesgedrag tussen de gekozen stimuli, alvorens de taak in goal #3 in combinatie met de structurele anatomie te koppelen. Binnen goal #3 staan alle 4 subgoals voldoende zelfstandig om ook apart uitgevoerd te kunnen worden.

3.3. Belang

Vraag:

1. *De DEC-UM verzoekt U nog eens naar de laatste zin te kijken, de DEC-UM vraagt zich af wat U hiermee bedoelt.*

Antwoord:

Zoals reeds aangehaald is het objectief van die onderzoeksvoorstel voornamelijk van fundamenteel wetenschappelijke aard. Desalniettemin willen we ook speculeren naar mogelijke klinische toepasbaarheid van de verwachte resultaten. Zo zou het best kunnen dat serotonine een heel groot effect uitoefent op patroon separatie. De muizen in onze proeven zouden bv. door upregulatie van serotonine minder overgeneralisatie kunnen vertonen in vreesgedrag tot gelijkaardige tonen. Dit zou dan kunnen inhouden dat we door toediening van SSRI's een gelijkaardig gedragseffect bij mensen lijdend aan PTSS kunnen bewerkstelligen. SSRI's zijn antidepressiva die zorgen voor meer serotonine in de synaptische spleet door de uptake en de daaropvolgende afbraak van serotonine te verhinderen. De toediening van SSRI's zou dan in combinatie met cognitieve gedragstherapie gegeven kunnen worden waarbij onder supervisie van een psychotherapeut het geheugenspoor van de traumatische gebeurtenis stelselmatig wordt geheractiveerd.

3.4.2

Vraag:

1. *Is een random-selectie van dieren voor doel 2 aanvaardbaar? Is het niet noodzakelijk om dieren met een veranderd gedragspatroon te selecteren?*

Antwoord:

Het uitvoeren van de structurele mapping bij enkel muizen die een veranderend gedragspatroon vertonen is ons inziens niet relevant. We verwachten niet dat op die korte termijn de serotonerge projecties vanuit de DRN compleet veranderd zullen zijn. In dat opzicht is een random selectie een valabele optie. Stel dat dit toch het geval zou zijn en zich slechts zou voordoen bij een handvol dieren, dan hebben we, indien we enkel deze muizen zouden selecteren, een structurele mapping uitgevoerd bij dieren die eerder de uitzondering dan de regel zijn. We willen deze structurele mapping zo breed mogelijk houden, vandaar een tweede argument voor de random selectie.

3.4.3

Vraag:

1. *De DEC-UM vraagt de onderzoekers een figuur met go-nogo momenten bij te voegen.*

Antwoord:

Deze figuur is toegevoegd.

3.4.4

Appendix 1

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *Er wordt aangegeven dat het gedrag wordt aangeleerd door dagelijkse handeling gedurende max. 2 weken. Houdt dit dan ook in dat de muizen dagelijks eens shock krijgen bij inoefenen 15 kHz? Dit is tegenstrijdig met wat aangegeven is 3.4.2.*

Antwoord:

Nee, de muizen krijgen slechts eenmalig een shock bij de geconditioneerde stimulus, hetzij de 15kHz, hetzij de 2.5 kHz toon (gecontrabalanceerd design). De dagelijkse handelingen bestaan uit het vertrouwd maken van de muis met de experimentator en de experimentele setting, dit gedurende een tweetal weken, waarbij er nog geen toon-schok associatie is toegepast. De eerste week bestaat uit het vertrouwd maken met de experimentator en het uit de kooi gehaald worden.

De tweede week bestaat uit het vertrouwd maken met de experimentele opstelling waarbij we met een overhangende camera op compleet niet-invasieve wijze de locomotie van de muis in de opstelling filmen.

Ald deze handeling-fase van 2 weken achter de rug is, start de eigenlijke toon-schok associatie. Nogmaals, slechts eenmalig zal een toon geassocieerd worden met een schok.

2. *Wat wordt de sequentie van stimulus: oplopende kHz, eerst 15kHz daarna lager, ...?*

Antwoord:

Er wordt geen sequentie gepresenteerd. Er zal altijd slechts een toon per keer gepresenteerd worden. Voor een deel muizen zal 15kHz met de schok geassocieerd worden, voor het andere deel muizen zal dit de 2.5kHz toon zijn. Dit binnen het kader van een gecontrabalanceerd onderzoeksdesign. De andere ongeconditioneerde tonen zullen at random, opnieuw een per keer, gepresenteerd worden.

3. *Letzkus et al. hadden kennelijk genoeg aan 20 muizen per conditie en experiment (zie appendix 3 onder A, laatste zin). Waarom de onderzoekers hier 3 keer zoveel muizen nodig hebben, wordt niet duidelijk in de uitleg in de een na laatste alinea van A. Er zijn toch niet 3 condities?*

Antwoord:

Inderdaad, er zijn geen 3 condities en inderdaad we calculeren een factor 3 in het aantal dieren noodzakelijk voor dit specifieke gedragsexperiment. De logica van deze factor wordt ons insziens duidelijk in het projectvoorstel weergegeven: *"Letzkus and colleagues (2011) needed a smaller amount of mice in their behavioral task because they were merely interested in the difference in amount of freezing behavior between two stimuli. They used auditory sweeps, a tone varying from low to high frequency versus another tone varying from high to low frequency. We are interested in documenting generalization in freezing to parametrically varying tones with less differences in-between than the sweeps used by Letzkus and colleagues (2011). Therefore we expect to use more mice, factor 3 compared to their study."*

Met heel veel plezier trachten we dit hier opnieuw uit te leggen. De twee auditieve sweeps die Letzkus en collega's gebruikten verschilden heel erg van elkaar, hadden een heel grote discriminatieve waarde. De discrete, kortdurende stimuli die wij gaan gebruiken voor het testen van overgeneralisatie en de rol van serotonine hierin, verschillen heel wat minder van elkaar, hebben minder discriminatieve waarde. Dit impliceert dat we meer dieren nodig hebben om tot duidelijke resultaten te kunnen komen. Anderzijds kunnen we ook niet kiezen voor heel erg van elkaar verschillende stimuli.

Dit zou inhouden dat onze *freeze-tuning curves* te steil zouden verlopen waardoor we een mogelijk effect van serotonine op deze *tuning curves* zouden missen. 60 muizen lijkt ons een acceptabele hoeveelheid voor het valideren van ons gedragsparadigma.

4. *U spreekt hier over een diermodel waarbij de angst die opgeroepen wordt door het geluid na een week of twee verdwijnt. In hoeverre is dit vergelijkbaar met PTSD, waarbij met name het chronische aspect van de angst ook een enorme impact heeft?*

Antwoord:

De vooropgestelde termijn van twee weken waarna extinctie bij muizen is louter hypothetisch en niet gebaseerd op empirische observatie. Het is niet uitgesloten dat de termijn van extinctie nog langer doorebt en in dat opzicht er dus meer gelijkenissen zijn met PTSS bij de mens. Tevens dient men er rekening mee te houden dat men bij het uitdenken van experimenten bij proefdieren steeds de humane pathologie zo goed mogelijk tracht te benaderen, maar dat er altijd abstractie gemaakt dient te worden.

We hadden de vrees conditionering nog meer salient kunnen maken door de muizen bv. een tijd, gecontroleerd, in een kooi met bepaalde context (horizontale strepen, hexagon vorm, bepaalde geur etc.) en een predator (vb. kat) kunnen plaatsen. In zeker opzicht zou dit de humane realiteit nog meer benaderen, maar we kunnen ons voorstellen dat de DEC-UM hier bezwaar tegen zou indienen. Wij zouden dit althans bezwaarlijk kunnen goedkeuren.

5. *Wat is de reden dat U de dieren die geen virusinjectie krijgen, gaat opofferen?*

Antwoord:

Deze dieren worden niet meer verder gebruikt in experimenten. Het alternatief dat deze dieren een natuurlijke dood tegemoet gaan in ons instituut lijkt ons inziens niet preferabel, noch voor de dieren zelf aangezien ze dan toch een opgesloten leven zouden moeten lijden, noch voor het instituut wegens de hiermee geassocieerde kosten voor onderhoud.

B. De Dieren.

6. *Kijkt men wel naar emotionele PS (versus cognitieve PS)? Anders gezegd. Is faulty emotionele PS wel een probleem bij PTSD? Is faulty cognitieve PS wel een probleem bij PTSD? Is het wellicht een bijkomstigheid (gevolg) van de ziekte en gaat het niet meer om de rem op emotionele responsen die bepaalde stimuli met zich meebrengen? Hoe houdt men rekening met (corrigeert men voor) alternatieve verklaringen voor gevonden gedragseffecten binnen het huidige design?*

Antwoord:

Onze betrachting is net het onderzoek naar de mogelijkheid en verklaringsgrond van een cognitief proces, m.n. patroon separatie als determinant voor angststoornissen en meer specifiek PTSS. Als hypothese schuiven we net een faulty cognitieve PS naar voren. De suggestie gegeven door de DEC-UM dat het eerder een probleem is van (geen of in mindere mate) rem op emotionele responsen is een heel valabele suggestie, maar ligt niet in het bestek van dit onderzoeksvorstel. Door de stimuli dusdanig parametrisch te creëren in de voorgestelde discriminatie taak trachten we op gedragsniveau cognitieve patroon separatie/completie zo goed als mogelijk te benaderen. Dit stelt ons dan ook in staat om het onderliggende neurale circuit en de rol van serotonine hierin aan de hand van optogenetische neuromodulatie te toetsen.

7. *Verwacht men geen uitval?*

Antwoord:

We verwachten slechts minimaal tot geen uitval. Door de legio ervaring van de hoofdonderzoeker van dit project in het uitvoeren van gedragstaken bij knaagdieren zal uitval geminimaliseerd worden.

8. *U gaat de muizen in paren huisvesten. Denkt U last te zullen gaan hebben van 'sociale buffering'? Hoe ondervangt U dit?*

Antwoord:

Het effect van sociale buffering op onze gedragstaak vormt geen enkel probleem. Het effect van ondermaatse patroon separatie en de rol die serotonine hierin kan spelen zal individueel binnen iedere muis zelf gemeten worden. Voor iedere muis bekomen we een *freeze tuning curve/functie* waarvan we de hellingsgraad overheen muizen kunnen middelen. Iedere muis zal gepaard gehuisvest worden waardoor er geen onderlinge verschillen bestaan tussen de muizen in onze experimenten.

C. Hergebruik.

9. *Is er een reden dat U 20 dieren moet opofferen voor het bestuderen van de hersenen? Dit aantal lijkt nogal veel?*

Antwoord:

Uit de in totaal 60 dieren die betrokken worden in de gedragstaak zullen een 20-tal dieren verder gaan in de structurele mapping experimenten. Deze 20 muizen zullen dan een korte operatie met virale injectie ondergaan, een operatie die om en bij de 30-60 minuten duurt. We schatten hiervoor een 20-tal dieren te zullen nodig hebben aangezien we een uitgebreide 3D kaart van projecties vanuit DRN naar de verschillende hersengebieden willen opstellen. De overige 40 dieren, zonder virale injectie, zullen gesacrificeerd worden volgens protocol in het instituut. Het lijkt ons daarom nuttig om toch voldoende dieren te gebruiken voor de structurele mapping. We willen zeker een goed beeld krijgen van de anatomische projecties. Beide groepen muizen worden sowieso gesacrificeerd.

10. *U vraagt 60 dieren in deze appendix. Daarvan gaat U er 20 injecteren met een virus, 20 offert U op. En wat gebeurt er met de overige 20 dieren?*

Antwoord:

Deze interpretatie van het DEC-UM is niet volledig correct, veroorzaakt door het onduidelijk vermelden van het aantal dieren en/in de verschillende experimenten. Hier volgt een nieuwe poging. In totaal worden #60 muizen betrokken bij de experimenten in Appendix #1. Alle muizen ondergaan de stimulus discriminatie taak waarbij er eenmalig een toon met een elektrische schok geassocieerd zal worden. Voor #30 dieren zal dit de 15 kHz toon zijn (cf. groep #1), voor de overige #30 dieren zal dit de 5 kHz toon zijn (cf. groep #2). Daarna zal at random #20 dieren met de tracer geïnjecteerd worden. Dit kunnen zowel de dieren uit groep #1 of groep #2 zijn. Uit welke van deze twee groepen de dieren komen maakt niet uit. Deze #20 dieren zullen dan na 2 weken expressie gesacrificeerd worden voor histologische analyse van de projectie banen vanuit de DRN. De overige #40 dieren worden volgens protocol gesacrificeerd zonder tracer injectie en zonder histologische analyse.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

11. *U geeft aan het aantal te minimaliseren door gebruik te maken van een power analyse, is dat correct? Onder punt B "de dieren", schrijft U iets anders.*

Antwoord:

We begrijpen de discrepantie en hebben het stuk over de power analyse onder sectie D verwijderd uit het project. Een power analyse uitvoeren is niet mogelijk omdat er voor de discriminatie taak die wij hier willen gebruiken, geen voorgaande data/resultaten beschikbaar zijn.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.

12. *De DEC-UM begrijpt dit stuk niet zo goed. Wat gaat U precies doen met de 40 dieren die niet doorgaan naar experiment 2? En de dieren die naar experiment 2 gaan, daarvan moet U de hersenen bestuderen en dus moeten ze geëuthanaseerd worden?*

Antwoord:

Zie tevens weerwoord onder objectie #11.

L. Wijze van doden.

13. *Mogelijk kunt U wat nader onderbouwen waarom een aantal dieren wordt gedood, want het noemen van enkel post-mortem histologie komt wat summier over.*

Antwoord:

Hier begrijpen we de DEC-UM niet goed. Van de in totaal #60 dieren die de gedragstaak zullen ondergaan, worden #20 dieren geïnjecteerd met de tracer. De hersenen van deze #20 dieren zullen na transccardiale obductie histologisch onderzocht worden onder de twee-foton microscoop. De overige #40 dieren kunnen niet “eeuwig” blijven leven in het animalarium van de UM alvorens een natuurlijk dood te sterven. Deze dieren zullen dus gesacrificeerd dienen te worden. Tenzij er een valabel alternatief door de DEC-UM wordt voorgesteld?

Appendix 2

Algemene opmerkingen:

1. *Kan deze appendix niet samengevoegd worden met appendix 1, aangezien de muizen gebruikt voor deze aim 2 vnl. post euthanasie experimenten ondergaan?*

Antwoord:

Dit had inderdaad een mogelijkheid kunnen zijn, maar omwille van de structuur van het project en het feit dat deze aanvraag al heel wat iteraties met de IVD heeft ondergaan waarbij een scheiding initieel door IVD werd voorgesteld, hebben we geopteerd dit zo verder uit te werken. We zien geen inhoudelijke redenen om dit nu wel samen te voegen.

2. *De DEC-UM weet niet zeker of zij het doel van dit experiment begrijpt. U schrijft dat U serotonerge regio's in de hersenen in verband wilt brengen met andere hersenstructuren in de getrainde muizen.*

Hoe belangrijk is het dat het getrainde muizen zijn? In appendix 1 zegt U dat U niet verwacht dat het effect van de primair opgewekte angst na 2 weken nog zichtbaar is in de gedragstesten. Daarna gaat U pas virus injecteren en dan wacht ook nogmaals een paar weken. Verwacht U hier ook maar iets te kunnen zien in de hersenen dat verband houdt met de angstprikkel?

Antwoord:

Naar onze mening wordt er nergens in Appendix #2 aangehaald dat de tracer injecties in getrainde muizen dient te gebeuren. Er staat weliswaar, in de eerste zin, dat injecties in “trained mice” zullen gebeuren, maar hiermee verwijzen we naar het feit dat we #20 muizen uit Appendix #1 zullen gebruiken, muizen die “getraind” zijn, deze dieren recupereren en hiervoor dus geen #20 nieuwe of ook “niet-getrainde” muizen voor moeten gebruiken. We hopen hiermee de onduidelijkheid te hebben verholpen.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *U wilt ad random 20 dieren uit appendix 1 selecteren voor deze appendix. Hoe random is dit?*

Houdt U rekening met sociale stress wanneer U opnieuw dieren die elkaar niet gewend zijn bij elkaar gaat zetten? Zullen de dieren in paren of in groepen gehuisvest worden?

Antwoord:

Dit is volledig at random. De dieren zullen hooguit 30-60 minuten uit de kooi genomen worden voor de eigenlijke operatie van tracer injectie. Daarna worden ze weer bij elkaar geplaatst. Dezelfde paren als voorheen zullen gebruikt worden. Het kan voorkomen dat slechts 1 of allebei de muizen de tracer injectie zullen krijgen. De injectie heeft hoegenaamd ook geen enkel effect op het gedrag van de muis eens de anesthesie is uitgewerkt.

2. *Bij het injecteren van de Cre muizen vraagt de DEC-UM zich af of U een controle groep heeft geïncubeerd en of U dat zinvol lijkt? Dezelfde vraag geldt ook voor heel exp. 3. U beschrijft daar dat de muis zijn eigen controle is, kan dat voor iedere situatie?*

Antwoord:

Voor de tracer injectie (Appendix #2) is een controle conditie niet nodig. Voor de gedragscomponent (Appendix #1) vormt iedere muis zelf zijn eigen controle; voor iedere muis bekomen we een *freeze tuning curve/functie* waarvan we de hellingsgraad overheen muizen kunnen middelen. Voor de optogenetische experimenten onder Appendix #3 is de suggestie van het DEC-UM om een controle groep toe te voegen heel correct. We hebben bijgevolg een controle groep van #10 dieren aan iedere subgoal toegevoegd. Deze dieren zullen een sham-injectie krijgen van een niet-Cre afhankelijk virus van dezelfde hoeveelheid als het Cre-afhankelijke virus. De aantallen benodigde dieren voor Appendix #3 zijn daarom aangepast.

B. De Dieren.

3. *De DEC-UM waardeert dat de onderzoekers proberen vermindering en verfijning te bereiken door aims 1 en 2 te combineren. Echter het is de DEC-UM niet duidelijk hoe de onderzoekers omgaan als aim 1 niet uitvoerbaar is.*

Antwoord:

Aim 1 zal altijd uitvoerbaar zijn. We zien niet in waarom de DEC-UM hier anders over denkt. We hebben volledige controle over de stimuli en zullen indien we merken bij de eerste muizen dat de 2.5 kHz stimulusverschillen te klein zijn deze stap vergroten tot vb. 4 kHz of 5 kHz. Door net te kiezen voor dit type van discriminatie taak hebben we enorm veel controle en invloed op het slagen van de gedragsexperimenten voorgesteld in Appendix #1.

4. *Krijgen de dieren na de chirurgie enkel ad libitum water gedurende 2 weken?*

Antwoord:

Ja, in elk van de voorgestelde experimenten krijgen de muizen ad libitum water en voedsel.

5. *Verwacht men geen uitval?*

Antwoord:

We verwachten slechts heel minimaal tot geen uitval. De hoofdonderzoeker heeft heel veel ervaring met virale tracer injecties in andere hersengebieden. We dienen bij dit soort injecties heel zorgvuldig om te gaan met de sinus cavernosus, maar als we standaard stereotactische injectie protocollen opvolgen vormt dit geen enkel probleem.

J. Humane eindpunten.

6. *Wat is 'elephant arched back'?*

Antwoord:

We realiseren ons dat de benaming misschien niet volledig correct is. We verwijzen naar een gekromde rug, wat deels lijkt op een olifantenrug. Het is een klinisch teken van onbehagen bij een knaagdier. Zie bijgevoegde foto.



Appendix 3

Algemene opmerking:

1. *Zie ook de vragen bij de andere appendices.*

Antwoord:

Bij onze replieken op de opmerkingen bij de andere appendices hebben we ook de experimenten uit Appendix #3 betrokken.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *Kunnen de verschillende sub-doelstellingen schematisch verduidelijkt worden?*

Antwoord:

We presenteren onder Sectie A reeds #2 figuren waaronder ook een uitgebreid schema. Misschien dat de DEC-UM kan verduidelijken wat ze precies bedoelen met “schematische verduidelijking”?

B. De Dieren.

2. *Is sociale huisvesting wel mogelijk gezien de fibers en elektrodes?*

Antwoord:

Ja, dit is geen enkel probleem. De fibers zijn geïmplantéerd en steken slechts enkele millimeter uit boven de cement cap op de schedel van de muis. Tijdens het eigenlijke experiment worden de muizen gekoppeld met flexibele fibers via dat klein uitstekend stukje fiber aan de lasers. De elektrodes steken op een zelfde minimale manier uit boven de cement cap. De muizen kunnen hierdoor nog steeds vrij en zonder problemen hun kooien exploreren.

3. *In Appendix 3 wordt beschreven dat 30 dieren uit aim1 en 60 dieren uit aim 2 worden gebruikt – ook hier vraagt de DEC-UM voor een onderbouwing wat betreft go-nogo momenten.*

Antwoord:

Dit punt van de DEC-UM begrijpen we niet goed. #30 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #1; #60 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #2; #60 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #3; #30 dieren + #10 dieren (controle conditie) ondergaan het experiment onder subgoal #4. We begrijpen niet goed wat de DEC-UM bedoelt met go-nogo momenten. Het betreft hier seriële experimenten, waarbij er enkel wordt overgegaan naar het volgende subgoal na behalen vorige subgoal. De subgoals zijn zodanig opgesteld dat ze van breed naar specifiek gaan. We hebben ons hierbij deels gebaseerd op voorgaande, gepubliceerde studies (McDevitt et al., 2014). Eerst onderzoeken we de gedragsmatige effecten bij volledige activering van alle neuronen in DRN.

Daarna zoemen we in op enkel de serotonerge neuronen in DRN waarbij we kijken naar de meest effectieve fase waarin deze neuronen betrokken zijn, tijdens de leer- (*acquisition phase*) dan wel ophaal-fase (*retrieval phase*). Vervolgens kijken we, voor de fase met grootste effect, welke projectie vanuit de DRN de grootste gedragsverandering veroorzaakt bij optogenetische stimulatie. Tenslotte kijken we voor de fase en voor de projectie vanuit DRN met de grootste gedragsverandering wat er gebeurt op elektrofysiologisch niveau, i.e. actie potentialen.

Referentie

McDevitt RA, Tiran-Cappello A, Shen H, Balderas I, Britt JP, Marino RA, Chung SL, Richie CT, Harvey BK, Bonci A. (2014). Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: differential participation in reward circuitry. *Cell Rep*; **8**:1857-1869.

4. *Het aantal dieren per groep is niet duidelijk. Het lijkt om groepen van 30 dieren te gaan? Maar is, getuige de laatste zin van A, het doel niet 20 per groep?*

Antwoord:

Zie tevens onze voorgaande repliek. Inderdaad we gaan uit van #20 dieren per groep. Dit klopt met hoe het beschreven staat in het project. Hier volgt verduidelijking. Subgoal #1 omvat #20 dieren per groep met nog eens #10 extra dieren voor een pilot experiment, dit om vb. de hoeveelheid virus, de exacte stereotactische coördinaten, de optimale virale expressie tijd etc. te fine-tunen. Hierbij hebben we dan nog eens #10 controle dieren aan toegevoegd, dus een totaal van #40 dieren. Subgoal #2 omvat 3 condities, waarbij we telkens #20 dieren per conditie willen testen, dus een totaal van #60 dieren, hierbij dan nog eens #10 controle dieren, dus een totaal van #70 dieren. Subgoal #3 omvat opnieuw 3 condities, waarbij telkens #20 dieren per conditie, hierbij nog #10 controle dieren, dus een totaal van #70 dieren. Subgoal #4 omvat slechts een conditie, mn. de beste projectie vanuit DRN waarbij het grootste effect op de gedragsmatige freeze tuning curves, maar omdat het elektrofysiologische metingen betreft willen we graag iets meer dan #20 dieren testen, vandaar het streven naar #30 dieren in dit subgoal, met nog eens #10 controle dieren, een totaal van #40 dieren voor dit subgoal. In totaal voor Goal #3 Functionele Connectiviteit dus: $40+70+70+40 = 220$ muizen. Zie tevens de aangepaste Tabel 1.

5. *Verwacht men geen uitval?*

Antwoord:

Ja, uitval is mogelijk omdat het hier toch wel relatief moeilijke experimenten betreft. Vandaar dat we voor #20 dieren per conditie gaan. Op basis van de invloedrijke studie van Letzkus et al. (2014) worden 12-15 “goede” muizen als standaard beschouwd. Met #20 dieren per conditie hebben we dus een buffer tegen uitval van om en bij de #5 muizen.

6. *U vraagt om nogmaals 150 dieren. Echter, kunt U niet de 20 dieren zonder bestemming van appendix 1 hergebruiken, bijvoorbeeld voor de pilot van doel 1?*

Antwoord:

Dit is niet mogelijk omdat de dieren in Appendix #3 eerst geïnjecteerd gaan worden alvorens blootgesteld aan de toon-schok associatie.

7. *Hier rijst de vraag wat het nut nog is van het experiment in appendix 1? Wanneer U een reeds gevalideerd diermodel voor PTSD gebruikt, hoeven de experimenten in appendix 1 dan niet uitgevoerd te worden?*

Antwoord:

Met de experimenten in Appendix #1 hopen we een stimulus discriminatie taak als benadering van patroon separatie, een alternatieve en cognitieve manier om te kijken naar angststoornissen te valideren. Het is dus niet een reeds gevalideerd diermodel voor PTSS. Dit hopen we met Appendix #1 te bekomen. Appendix #3 dient dan om de rol van serotonine op het gedrag gemeten met deze gevalideerde taak te onderzoeken.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

8. *U schrijft: “By choosing the mouse as our preferred animal model, exhibiting similar PTSD-like behavior as in humans, with behavioral tests alike the one presented here already validated, will result in data that can be extrapolated to human patients.” Kunt U dat nader toelichten? Hoe past appendix 3 in die extrapolatie?*

Antwoord:

Er worden binnen de functionele neurochirurgie al heel wat diepe hersenkern interventies gedaan bij legio neurologische en psychiatrische ziektebeelden, zie onder andere een heel recent review paper door Lewis en collega's (2016) in *Neuroscientist*. Optogenetische neuromodulatie wordt hierbij gezien als mogelijke opvolger van de elektrische hersenstimulatie. Een goed inzicht in het neurale circuit onderliggend aan ziektebeelden zoals PTSS en een goed inzicht in hoe optogenetische neuromodulatie als mogelijke therapie hierbij kan ingezet worden door dit eerst meticuleus te bestuderen in proefdieren, kan op de (middel)-lange termijn heel wat voordelen opleveren voor (humane) patiënten die lijden aan dergelijke ziektebeelden. Door gebruik te maken van het stimulus discriminatie onderzoeksdesign zoals reeds gevalideerd bij mensen (Lissek et al. (2010), Lau et al. (2011), Lissek et al. (2014a en 2014b) in onze muizen vereenvoudigen we de extrapolatie van onze onderzoeksresultaten enigszins.

Referenties

Lau JY, Britton JC, Nelson EE, Angold A, Ernst M, Goldwin M, Grillon C, Leibenluft E, Lissek S, Norcross M, Shiffrin N, Pine DS. (2011). Distinct neural signatures of threat learning in adolescents and adults. *Proc Natl Acad Sci USA*; **108**:4500-4505.

Lewis PM, Thomson RH, Rosenfeld JV, Fitzgerald PB. (2016). Brain neuromodulation techniques: A review. *Neuroscientist*; **22**:406-421.

Lissek S, Rabin S, Heller RE, Lukenbaugh D, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2010). Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *Am J Psychiatry*. **167**:47-55.

Lissek S, Bradford DE, Alvarez RP, Burton P, Espensen-Sturges T, Reynolds RC, Grillon C. (2014a). Neural substrates of classically conditioned fear-generalization in humans: a parametric fMRI study. *Soc Cogn Affect Neurosci*; **9**:1134-1142.

Lissek S, Kaczkurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. (2014b). Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biol Psychiatry*; **75**:909-915.

- Datum antwoord 04-01-2017
- Verstreckte antwoorden: Zie hierboven.
- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag, echter de DEC-UM had nog een aantal vragen(zie hieronder).

- De DEC-UM heeft op 10-01-2017 nog een aantal vragen gesteld aan de onderzoeker. Vragen met antwoorden(ontvangen 11-01-2017):

- 3.1. Bij vraag 2 merkt de DEC-UM op dat er ook onderzoeken zijn die suggereren dat “pattern separation and pattern completion” (deels) separate processen zijn met verschillende anatomische substraten (hippocampale subgebieden).

Antwoord:

Deze opmerking van de DEC-UM is zeer terecht. Gebaseerd op onder andere het werk van Dr. Knierim weten we dat patroon separatie zich voornamelijk afspeelt in de neurale respons patronen van de gyrus dentatus oftewel dentate gyrus (DG), terwijl patroon completie zich eerder afspeelt op niveau van cornu ammonis (Lee et al.,

2015). Een recent review paper van de hand van Dr. Knierim licht de aard van deze hippocampale verschillen verder toe (Knierim & Neunuebel, 2016).

Referenties:

Knierim JJ & Neunuebel JP. (2016). Tracking the flow of hippocampal computation: pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. *Neurobiol Learn Mem*;129:38-49.

Lee H, Wang C, Deshmukh SS, Knierim JJ. (2015). Neural population evidence of functional heterogeneity along the CA3 transverse axis: pattern completion versus pattern separation. *Neuron*;87:1093-1105.

- 3.4.2. *Het uitvoeren van de structurele mapping bij enkel muizen die een veranderend gedragspatroon vertonen, is volgens de DEC-UM niet relevant. De DEC-UM verwacht niet dat op die korte termijn de serotonerge projecties vanuit de DRN compleet veranderd zullen zijn. Gaarne in oogachting nemen dat basis/capaciteit om op stimulus te reageren ('veranderd gedragspatroon) reeds biologisch en (functioneel) anatomisch aanwezig kan zijn vóór ingrijpen. Ofwel primaire variatie in serotonerge functie kan respons wellicht voorspellen.*

Antwoord:

We danken de DEC-UM voor het volgen van onze redenering zoals geponeerd in de (voorgaande) wijzigingsbrief. We denken inderdaad ook dat de gedragspatronen, al dan niet veranderd na conditionering, het resultaat zullen zijn van de aanwezige structureel, anatomische connecties, waarop dan functionele modificaties kunnen inspelen. Qua metafoor kan men bijvoorbeeld denken aan reeds aanwezige bekabeling van een huis waardoor je lamp gaat branden (noodzakelijke anatomische voorwaarde) waarbij je met een schakelaar de sterkte kan fine-tunen (voorwaardelijke functionele modificatie).

- *Appendix 1. B. Vraag 7. Als U louter en alleen naar cognitieve PS wil kijken, waarom hanteert U dan geen puur cognitieve PS taak of voegt U deze niet toe (d.a. OLT-variant)? Door de huidige studieopzet is het juist moeilijk te onderscheiden of een eventueel verschil in performance in de huidige taak een primair cognitieve of emotionele basis heeft. Juist ook omdat U een model en test in één concept verenigd hebt.*

Antwoord:

Binnen de UM is bij de start van het project overleg geweest m.b.t. het al dan niet implementeren van de OLT taak. Omwille van het beperkt aantal trials die men bij de OLT kan doen en de moeilijke parameterisatie (stimulus controle) leek deze taak ons minder geschikt om patroon separatie/completie vanuit een (puur) cognitieve hoek te benaderen. De huidige discriminatie taak met verschillende frequenties lijkt ons eerder geschikt m.b.t. beide objecties: veel trials mogelijk met daarbij heel veel controle over de aangeboden stimuli.

We zien niet zo goed in waarom deze taak minder geschikt zou zijn dan de OLT taak wat betreft het dissociëren van cognitie en emotie? Ook bij de OLT zou je een locatie dienen te associëren met de elektrische schok. Wat zou dan beletten dat de muis geen gegeneraliseerde angst vertoont t.a.v. andere locaties, m.a.w. eerder problematische emotionele dan wel cognitieve patroon separatie vertoont? Graag geven we gehoor aan de suggestie van de DEC-UM indien we de achterliggende redenering beter begrijpen.

- *Indien U na de laatste waarneming bij dieren die U niet hoeft te doden in het kader van Uw experiment, deze niet bestemd voor adoptie, dan gaat de DEC-UM er vanuit dat U de dieren retourneert aan de proefdierfaciliteit, waar de dierenarts of een andere terzake deskundige het lot van de dieren bepaalt.*

Antwoord:

Inderdaad, de dieren zullen dan geretourneerd worden aan de proefdierfaciliteit alwaar een dierenarts over het lot van de dieren bepaalt.

- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts: (niet lid van de DEC-UM) **N.V.T.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. Immers, de verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven als tussen de doelstellingen beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën)

aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

Zie antwoord op vraag C5.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel wetenschappelijke project, dat gericht is op inzicht in de rol van het serotonerge systeem bij post-traumatische stress stoornis (ptss), zijn: *de proefdieren, de onderzoekers, de uiteindelijke doelgroep, nl. degenen die lijden aan ptss en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.*

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan en de opoffering aan het eind van de proeven. De proefdieren zullen gering dan wel matig ongerief ondervinden.*

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: *De onderzoekers vergaren kennis over de achterliggende oorzaken van ptss, de onderliggende neurale netwerken en de invloed van het serotonerge systeem. Op basis hiervan hopen zij uiteindelijk klinisch relevante interventies te kunnen ontwikkelen. De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen die relevant is in het onderzoek en uiteindelijk ook in de behandeling van ptss en deze kennis delen met de wetenschappelijke gemeenschap.*

Waarden die voor degenen die lijden aan ptss bevorderd worden: *Uiteindelijk kan meer kennis over de neurobiologische achtergrond van hun symptomen leiden tot verbeterde therapeutische mogelijkheden. Daardoor zou de kwaliteit van leven van deze patiënten en hun naasten verbeterd kunnen worden. Groei van medische kennis en mogelijke uitbreiding van het therapeutische arsenaal op een gebied waar daaraan behoefte is, i.c. de psychiatrie, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe.

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

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe.

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

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

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

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe.

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

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.

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

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord.

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

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 antwoord toe.

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

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

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

In onderhavige projectaanvraag worden niet dieren van een eenvormig geslacht gebruikt. Alhoewel de DEC-UM 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 de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

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

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar het hier niet handelt om niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren.

NTS

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

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol van het serotonerge systeem bij post-traumatische stress stoornis, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project The role of serotonin in post-traumatic stress disorder?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

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

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

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

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de medische wetenschap en de samenleving in het algemeen en van de patiënten en hun naasten binnen het project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na gering en matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten en de consequenties daarvan in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren wordt geschaad door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan, en door de opoffering aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot kennis over de achterliggende oorzaken van ptss, de onderliggende neurale netwerken en de invloed van het serotonerge systeem. Er zullen nieuwe doelwitten worden geïdentificeerd als basis voor nieuwe therapeutische strategieën.

De verwachting is dat de verworven inzichten op termijn bouwstenen kunnen leveren voor een betere behandeling van mensen die lijden aan ptss. Ptss komt wereldwijd voor, onder andere als gevolg van oorlogen en andere geweldsituaties. Ptss kan relatief jonge mensen treffen en resulteren in een aanzienlijke en langdurige ziektelast, die niet alleen voor de patiënt maar ook voor diens naasten moeilijk te dragen is.

Het huidige therapeutische arsenaal is beperkt. Door een verbeterde therapie zou uiteindelijk de kwaliteit van leven verbeterd kunnen worden van belangrijke aantallen patiënten en hun omgeving.

Ptss kan het gevolg zijn van het uitvoeren van taken die de samenleving politiek wenselijk acht, zoals het verdedigen van het landsbelang of het dienen van de vrede.

Ook vanuit deze optiek heeft dit onderzoek belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. anesthesie en pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol van het serotonerge systeem bij post-traumatische stress stoornis, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder?" bevestigend. Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

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

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 De DEC-UM adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002017825

Bijlagen

1

Datum 20 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" met aanvraagnummer AVD107002017825. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 1 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 januari 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:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017825

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: 

I. G. de Peuter
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: Universiteit Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 1 maart 2022, voor het project "The role of serotonin in post-traumatic stress disorder" met aanvraagnummer AVD107002017825, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is senior post-doctoraal onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is biologische verantwoordelijke verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 januari 2017, ontvangen op 16 januari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Goal #1: Validation of behavioral paradigm				
	Muizen (Mus musculus) /	60	100% Licht	
3.4.4.2 Goal #2: Determine structural connectivity				
	Muizen (Mus musculus) / afkomstig uit bijlage 3.4.4.1	20	100% Matig	
3.4.4.3 Goal #3: Functional connectivity determined by optogenetic neuromodulation				
	Muizen (Mus musculus) /	220	100% Matig	

Aanvraagnummer:
AVD107002017825

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 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:

AVD107002017825

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:

AVD107002017825

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.