

Nadere vragen aanvrager

Op 31 december 2020 en 11 januari 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de gekozen modellen, proefopzet, humane eindpunten, ongeriefclassificatie en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

3 februari 2021

Aanvraagnummer:

AV [REDACTED] 202011285

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

3 februari 2021

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 202011285

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 10.2.e.eng
Adres: 10.2.e.eng
Postcode en plaats: 10.2.e.eng
Deelnemersnummer: 10.2.e.eng

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 februari 2021 tot en met 1 november 2025, voor het project "Investigating factors that influence epithelial repair in lung tissue" met aanvraagnummer AVD 10.2.e.eng 202011285, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.e.eng. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e.eng. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Analist verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 9 oktober 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 21 januari 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Effects of RANKL, MIF, and DDT in mouse lung organoids, zoals ontvangen op 21 januari 2020;
 - 3.4.4.2 Effects of RANKL, MIF, and DDT in mouse models of COPD and pulmonary fibrosis, zoals ontvangen op 21 januari 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 21 januari 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 17 december 2020
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 7 januari 2021, 21 januari 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Effects of RANKL, MIF, and DDT in mouse lung organoids			
	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6J muizen	149	100,0% Licht
3.4.4.2 Effects of RANKL, MIF, and DDT in mouse models of COPD and pulmonary fibrosis			
	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6J muizen	2.855	100,0% Matig

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer: AVD [REDACTED] 202011285

- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD 0202011285

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:
AVD 202011285

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.



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.

Addiction is a chronically relapsing condition that exerts a significant personal and financial cost to society. One of the most commonly abused *legal* drugs, nicotine, is responsible for a significant

proportion of this cost to society with yearly 20.000 deaths in the Netherlands with more than 2 million daily smokers. Another major concern in addiction care is the recent opioid crisis in the United States (US). Although non-medical opioid use has been declining in the Netherlands, medical prescription of opioid-painkillers (over 1 million in the Netherlands) poses a major threat to health. In 2017, more than 70,000 people died from drug overdoses in the United States, making it a leading cause of injury-related death. Of those deaths, almost 68% involved a prescription or illicit opioid. Therefore, opioid and tobacco use disorder are significant risk factor for premature death and disabilities.

Although the choice to try a drug for the first time is voluntary, it can be influenced by external factors such as peer pressure, price, and, in particular, availability. Nonetheless, most people exposed to drugs do not develop addiction. At some point after continued repetition of voluntary use, the ability to control its use is lost in a subset of people. At that point, there is a compulsive, often overwhelming involuntary aspect to continue nicotine and opioid use. Most importantly, short term (weeks to months) control over nicotine and opioids appears to be possible, but given enough time relapse invariably occurs after a period of abstinence.

Recent advances in our understanding of brain function have led to the conclusion that addiction is a biological disorder, in the same manner as other psychopathologies (Dackis & O'Brien, 2005, *Nat Neurosci.*). Just as a patient suffering from depression should not be told "snap out of it, just be happy", a patient suffering from substance use disorders cannot just "choose to stop taking drugs". Instead, the patient is in need of help and proper treatment to remain abstinent. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5) lists several criteria for a diagnosis of 'substance use disorder'. Whilst there are various factors which can lead to presentation with these symptoms, the key impediment to treatment is relapse. Relapse is a seemingly inevitable outcome, despite stated intentions to remain abstinent. What then, are the causes of relapse? Learned associations play an important role in nicotine and opioid addiction. With repeated drug use, the effects become associated with stimuli or cues in the environment, such as packaging, contexts, and people (Wikler, 1973, *Arch. Gen. Psychiatry*). These memories are notoriously difficult to remove, and they persist during abstinence long after cessation of opioid or nicotine use. Cues that are associated with opioids and nicotine are a key trigger for relapse, and thus critical for maintaining the cycle of opioid and nicotine addiction (Siegel, 1999, *Addiction*). Drug cues can be classified as discrete or contextual. Discrete cues are objects or sensory stimuli that are directly paired with the consumption of the drug, also referred to as drug paraphernalia. Contextual cues refer to the environment/context in which drug consumption takes place. Another factor that can trigger a relapse in abstinent drug users is re-exposure to the drug itself. A small amount of the drug taken after prolonged abstinence often causes strong craving and a so-called drug-induced relapse. There is considerable evidence that the effects of drug priming, discrete and contextual cues on drug seeking are mediated by partly distinct neural substrates (Bossert et al, 2013, *Psychopharmacology*). Treatment strategies for addiction focus on prevention of relapse, but to date these medications have limited efficacy. In this project we propose to evaluate the effects of a medication (that is used worldwide as a treatment for malaria and also as an anti-cancer drug) on the addictive properties of nicotine and opioids. We believe this drug has potential anti-addiction properties based on its actions on GABA receptors. GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the CNS and exerts its effects through activation of GABA-A and GABA-B receptors. There are several lines of evidence showing that GABA signalling and in particular through the GABA-A receptor (GABAAR) is disturbed in addiction. Our own research has shown, using a rat model of nicotine addiction, that exposure to nicotine-associated cues (evoking relapse behaviour) resulted in a rapid increase in the availability of GABA-A receptors in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). Manipulation of the trafficking of these GABA-A receptors revealed that GABA-A receptors mediate an inhibitory effect on nicotine relapse and that further activation of GABA-A receptors in the dmPFC with the GABA-A receptor agonist muscimol strongly reduced the propensity to relapse upon exposure to nicotine cues. These results are in line with observations from human imaging studies that metabolic activity in the anterior cingulate cortex (ACC, the human equivalent of the dmPFC in rats) is strongly correlated with craving in human addicts (Volkow and Baler, 2014, *Neuropharmacology*) and studies showing reduced levels of GABA in the ACC of addicted subjects (Prescot et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*; Abé et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*) Variations in GABAAR also play a significant role in impulsivity traits that are related to drug abuse

(Stephens et al, 2017, Genes, Brain Behav.). In humans the GABAAR gene subtype has been linked to a variety of clinical disorders characterized by a lack of impulse control and pharmacological activation of GABAAR reverses increased impulsivity and high alcohol consumption in rats (Gondré-Lewis et al, 2016, Stress). Finally, the neurotransmitter dopamine (DA), a critical moderator of addiction behaviour has recently been shown to act as a direct modulator of GABAAR, in particular of GABAA receptors carrying the $\beta 3$ subunit (Hoerbelt et al, 2015, J Neurosci.). It has been postulated that high concentrations of DA (resulting from drug exposure) may result in a disrupted DA-GABA relationship in the brain. All these lines of evidence lead to the hypothesis that enhancing GABA-A transmission may have therapeutic value in the treatment of drug addiction.

There are several registered medications that enhance GABAAR-signalling, such as very recently shown for the natural occurring anti-malarial drug artemisinin (Klayman, 1985, Science). Artemisinin not only (a) enhances GABAAR signalling (Berishvili, 2017, Cell); (b) but also affects the GABAAR $\beta 3$ -subunit (its effects on GABAAR signalling are counteracted by the $\beta 3$ -GABAAR antagonist picrotoxin (Berishvili, 2017, Cell); (c) and has antinociceptive effects. The antinociceptive (pain-killing) effects of artemisinin are also mediated by activation of GABAAR (Dehkordi et al, 2019, Korean J Pain). This is of particular interest as the antinociceptive and reinforcing effects of opioids are also mediated through GABA neurotransmission. As such, artemisinin may directly interfere with the effects of opioids.

Importantly, artemisinin at clinically relevant doses is in general well tolerated with mild adverse reactions such as nausea, reduced appetite, vomiting in >10% of humans (Klayman, 1985, Science), also within its application in oncology (Slezakova and Ruda-Kucerova, 2017, Anticancer Res.). This is in contrast to most GABAAR agonists, including benzodiazepines, which have limited clinical utility because of sedative side-effects, dependence, tolerance and withdrawal (Fischer, 2017, CNS & Neurological Disorders).

Therefore, we postulate that artemisinin is a relatively safe and promising candidate for the treatment of opioid and nicotine addiction. Our studies will be a first step towards clinical evaluation of artemisinin in addiction treatment. Positive results will be used to design a first clinical trial in collaboration with addiction psychiatrists and treatment centers in the Netherlands. It is important to note that this is the first attempt to evaluate the potential anti-addiction properties of artemisinin. If a positive Proof-of-Concept outcome will be obtained in animals, we hope to get approval for testing in humans.

We have chosen to focus on both nicotine and opioids use in the same project. There is increasing evidence in the literature that different drugs of abuse act on different neurobiological mechanisms. Therefore, in this project we will use the same pharmacological approaches to study addiction to two different drugs of abuse. This will allow us to identify similarities and differences in the neurobiological substrates of addiction to these two drugs. Based on the literature and our own studies we speculate that artemisinin will reduce the reinforcing value of opioids and reduce cue-induced relapse to these drugs. We will use heroin as the opioid of choice in our experiments as we have ample experience with this drug in our animal models. It is important to note that opioids like heroin and the medically approved morphine, fentanyl and oxycodone, all exert their primary action through activation of the same mu-opioid receptor.

3.2 Purpose

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

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

The **main objective** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin-self-administration and relapse.

Opioid and nicotine addiction are chronically relapsing disorders that exert significant personal and social impact on society. There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions. **For instance, currently the most effective medication for nicotine addiction is varenicline (Champix). This**

drug was found to be effective in 30% of the users (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). All other medical therapies (e.g. bupropion, nicotine replacement) were found to be less effective.

Specifically, we aim to address the following questions:

1. Does acute administration of graded doses of artemisinin reduce (a) the reinforcing and motivational effects of nicotine and heroin and (b) cue-, context- and drug-induced relapse following abstinence.
2. Does chronic administration of an effective acute dose of artemisinin during abstinence reduce the propensity to relapse to heroin and nicotine seeking?
3. Are the relapse-attenuating effects of artemisinin mediated by the dorsal medial prefrontal cortex?

This would be the first study to evaluate artemisinin as a potential anti-addiction treatment. Given the strong predictive value of our models, positive results would be a major first step in the development of novel pharmacotherapies to treat tobacco and (prescription) opioid addiction and potentially other addictions.

We have budgeted 5 years for this project because each of the behavioral experiments takes approx. 3 months to complete. We have strong experience in the operation of behavioral experiments looking at self-administration and relapse. Furthermore, we have experience using the proposed methodology for intracranial infusions of drugs that are crucial to increase our understanding of the neural mechanisms and substrates of relapse.

Our facility has an adequate number of operant chambers, housing facilities, and full-time staff to complete all of these experiments within the 5-year time-frame of the protocol. Furthermore, all of the equipment is already present.

3.3 Relevance

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

In terms of scientific relevance, our study will contribute to a better understanding of the pharmacological mechanisms involved in nicotine and opioid addiction. In particular in relation to the role of GABA signalling in the reinforcing and motivational properties of opiates and nicotine and the role of the dorsal medial prefrontal cortex in relapse to opiate and nicotine addiction following abstinence. These experiments will generate novel findings on the effects of artemisinin on the addictive properties of opiates and nicotine, and such findings are of interest to the field of addiction and more generally to the fields of neuroscience.

In terms of social relevance, a World Health Organisation (WHO) report in 2009 identified nicotine addiction as the leading cause of premature death and disabilities in the developed world (http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf). WHO data indicate that there are more than 6 million annual deaths from smoking. The recent opioid crisis in the US is also a major concern with more than 70,000 deaths from overdose in 2017. Positive effects of artemisinin in our preclinical models of opioid and nicotine addiction could pave the way for new treatment strategies for these disorders. **An advantage is that it concerns an already existing medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. Unfortunately, no artemisinin-derivate is registered as a stand-alone medication in the EU and PO formulations are not available yet. Still, a proof-of concept in an animal study could strongly reduce the time and effort needed for approval and implementation of human treatment protocols.** Our team has strong collaborations with human addiction researchers working in specialized addiction care centres in the Netherlands. Promising results with artemisinin will be discussed with our clinical partners and will form the basis of a collaborative grant application that aims to study the anti-addictive properties of artemisinin in human addicts.

3.4 Research strategy

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

The **overarching aim** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse.

We are using well validated animal models of i.v. self-administration and relapse. These models allow us to evaluate effects of artemisinin on (a) the reinforcing properties of heroin and nicotine, (b) on the motivational properties of both drugs (using progressive ratio schedules of reinforcement) and (c) on cue-, context- and drug-induced relapse.

Although our main focus is on relapse prevention, it is important to also evaluate artemisinin effects on other behavioural readouts (e.g. drug consumption and the motivation to take drugs) to obtain a full picture of the potential therapeutic value of this compound and the underlying mechanisms.

First series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse. Doses of artemisinin will be based on recent literature showing antinociceptive effects in a dose range of 2.5 – 10 mg/kg following i.p. administration. These effects were blocked by a GABA-R antagonist, providing evidence that they were mediated through activation of GABA-A receptors. Therefore, we will use a similar dose range in our experiments. We will use a between-subject design (3 groups) to study the effects of 0, 3 and 10 mg/kg i.p. of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse to heroin and nicotine seeking in 4 separate experiments.

Second series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on drug consumption and on the motivation to use heroin and nicotine.

In case of nicotine; experiments will only be performed if the first series of experiments show a reduction in either cue-, context- or drug-induced relapse.

In case of heroin; given the fact that both artemisinin and opioids exert their effects directly or indirectly through GABA-A signalling, we speculate that the reinforcing effects of heroin will be affected by artemisinin. Therefore, regardless of the outcome of the relapse studies (that are performed under heroin-free conditions), we will conduct these experiments.

We will use a within-subject design to test 3 doses of artemisinin on heroin (or nicotine) self-administration under a fixed ratio schedule of reinforcement and under a progressive ratio schedule of reinforcement. The latter schedule is designed to measure the motivational properties of drugs.

Third series of experiments:

If positive effects on relapse are observed in our first series of experiments, we will here evaluate artemisinin in a more clinically relevant dose regimen (go/no go moment). In clinical settings medical treatment usually occurs with chronic treatment protocols where medication is taken for several weeks or months. In order to evaluate whether prolonged treatment with artemisinin will reduce the propensity to relapse, animals will receive daily injections of artemisinin during the 3 weeks abstinence phase of the self-administration – relapse protocol. We will use a between subject design with 2 groups. The dose of artemisinin will be based on the outcome of the first series of experiments.

Fourth series of experiments:

In a final set of experiments, we will test our hypothesis that the relapse-attenuating effects of artemisinin are mediated in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). To that end, animals will be implanted with guide cannula directed at the dmPFC, allowing intracranial infusion of artemisinin prior to the relapse test. These experiments will only be performed after a positive result on relapse in the first series of experiments (go/no go moment).

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.

Surgeries:

All rats will undergo surgery to implant the jugular vein catheter for i.v. nicotine or heroin self-administration. In the fourth series of experiments, rats will (in the same surgical session) also be placed in a stereotactic frame for intracranial implantation of guide cannula directed at the dorsal medial prefrontal cortex.

Artemisinin treatment:

In the first series of experiment we will evaluate the acute effects of artemisinin on relapse behaviour. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per relapse test and each rat will be tested twice. In second series we will evaluate the acute effects of artemisinin on the reinforcing and motivational properties of heroin and nicotine. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per test and each rat will be tested 6 times. In the third series of experiments we will evaluate the chronic effects of artemisinin on relapse. Rats will be injected daily with artemisinin or vehicle for 20 days. In the fourth series of experiments we will evaluate the acute intracranial (dmPFC) effects of artemisinin on relapse. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 µg) per relapse test and each rat will be tested twice.

Behavioural task:

The self-administration - relapse model consists of a **self-administration phase** during which responding on a lever results in the i.v. infusion of a drug (heroin or nicotine).

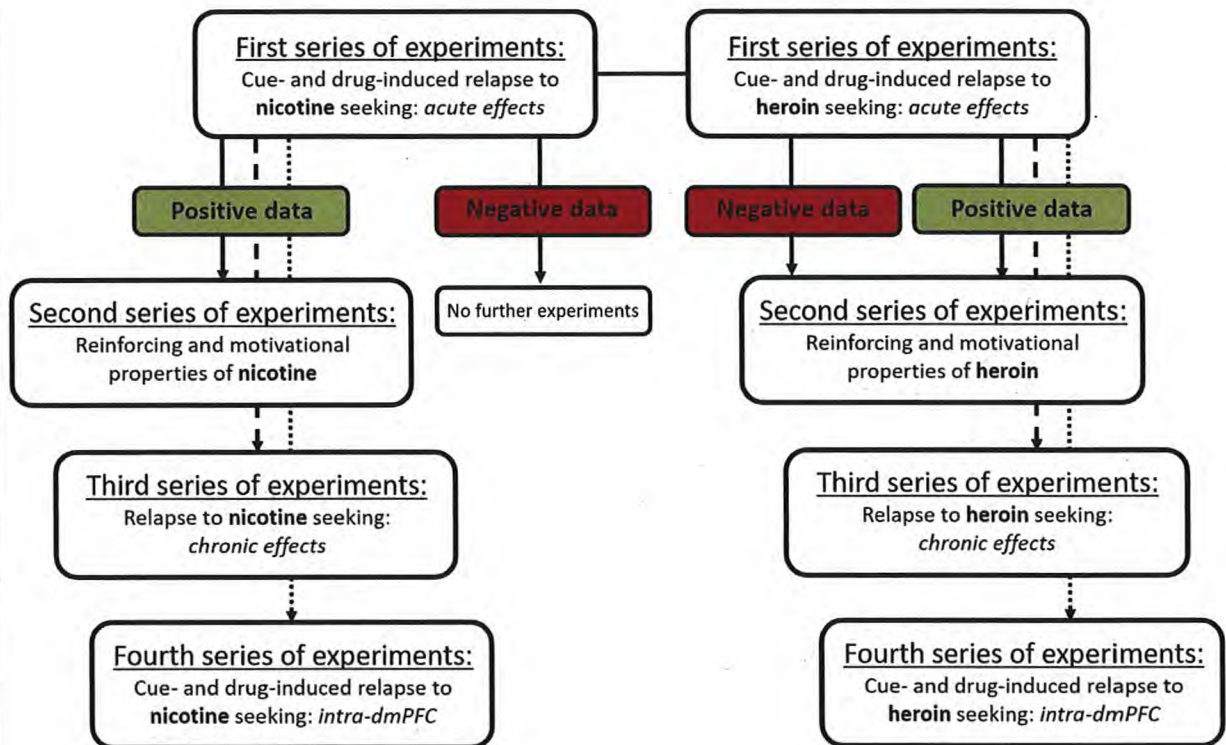
In a cue-induced relapse experiment a 5 second tone/light stimulus (discrete cue) is presented during the infusion. In some experiments, animals will be subjected to a progressive ratio schedule of reinforcement, tailored to measure the motivational properties of the drug. During a progressive ratio schedule, the number of lever presses needed to obtain an infusion of the drug will be progressively increased until a so-called breakpoint is reached. The self-administration phase is followed by an **extinction phase** during which responding for the drug will be extinguished. During this phase, lever presses do not result in drug delivery and presentation of the discrete cues. Subsequently, a relapse is provoked by re-introducing the discrete cues and the ability to respond for these cues. No drug is delivered during the relapse test. After the **cue-induced relapse test**, the discrete cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test. Previous work has indicated that drug-induced relapse is more robust in the presence of previously extinguished drug-associated cues.

In **context-induced relapse experiments**, rats will be randomly assigned to one of two different contexts. These contexts differ in **auditory** (white noise (70 dB), either continuous or interval (5 s on, 5 s off)), **olfactory** (either lemon-scented or almond-scented odour) and **tactile** cues (chamber floor: a flat PVC surface with either holes or straight grooves). The extinction phase takes place in the other context. During daily sessions in a distinct context and without drug delivery responding for the drug will be extinguished. Context-induced relapse is then tested by placing the rats again in the drug-associated (training) context with no drug delivery. After the context-induced relapse test, the drug cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test.

We will evaluate the effects of artemisinin on the different parameters of the behavioural task: on drug self-administration, progressive ratio responding and cue-, context- and drug-induced relapse.

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

The study as a whole is designed to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse. For each series of experiments, there are specific decision points that will guide future experiments.



Outline of decision points where rats will be used or not depending on the outcome of experiments.

The first series of experiments focus on the acute effects of artemisinin on cue- (discrete and context) and drug-induced relapse of nicotine and heroin seeking. Based on our previous work and that by others we hypothesize that artemisinin will be effective in reducing relapse to nicotine. If so, we will continue with the second, third and fourth series of experiments. If not, no further experiments with nicotine will be performed. In parallel, we will investigate the acute effects of artemisinin on relapse to heroin seeking. Again, positive effects will lead to the second, third and fourth series of experiments. If the first series of experiments with heroin yield negative results, we will still conduct the second series of experiments with heroin. This is because GABA-AR activation by artemisinin may directly interfere with the reinforcing effects of heroin. However, third and fourth series of experiments with heroin will not be performed in that case.

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	Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer [REDACTED], AVD [REDACTED] 20209667
2. Titel van het project:
Evaluation of artemisinin on the addictive properties of addiction nicotine and opioids
3. Titel van de NTS:
Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving?
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 09-04-2020
 - aanvraag compleet:
 - in vergadering besproken: 14-04-2020, 12-05-2020 en 09-06-2020
 - anderszins behandeld: n.v.t.
 - termijnonderbreking(en) van / tot: 16-04-2020 tot 02-05-2020 en 25-05-2020 tot 02-06-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: ja op 02-06-2020
 - aanpassing aanvraag: 02-06-2020
 - advies aan CCD: 10-07-2020
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: 09-04-2020
 - 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: 16-04-2020
- Strekking gestelde vragen: *De DEC heeft de aanvraag bekeken en heeft een aantal essentiële vragen die beantwoordt moeten worden voordat de DEC commissie een ethische afweging kan maken. Het gaat hierbij vooral om de beschreven belangen van het onderzoek en de 3V's. 1. NTS: Hierin staat een looptijd van 2 jaar(?), terwijl in het projectvoorstel (onderdeel 3.2) 5 jaar wordt genoemd. Dit lijkt niet te kloppen, graag nakijken en consistent maken. 2. Het lijkt hier te gaan om het testen van een geregistreerd middel/medicijn, dus waarom kun je dit niet direct in mensen/patiënten testen? (zie ook vervanging). Gaat het hier*

om een plantenextract? Is dit een geregistreerd middel? 3. De belangen van het onderzoek zijn nog niet helder voor de DEC: Graag krijgt men meer uitleg over het fundamentele wetenschappelijk belang van het onderzoek. Welke specifieke wetenschappelijke kennis verkrijgt je met de resultaten van dit onderzoek? Wat is precies het maatschappelijke belang van dit specifieke onderzoek? Wat is de translationele waarde? Zit de translatie wel in dit onderzoek? Indien nee, waarom niet? Indien ja, graag meer uitleg over waarom er sprake is van translatie. Worden er na dit onderzoek ook klinische trials in mensen/patiënten gedaan? 4. Moet je artemisinin je hele leven slikken om effect te krijgen? Of is het tijdelijk (is er een acute fase)? De context gerelateerde fase kan bij mensen meerdere jaren duren. Wat is de duur van de medicatie toediening bij de dieren? Hoe is dit vergelijkbaar met de humane situatie? Kunnen deze resultaten van de dierproef worden gegeneraliseerd? 5. Bijlage onderdeel A Onderbouwing proefopzet/experimenten: Het is de DEC niet duidelijk welke experimenten en handelingen er nu precies worden uitgevoerd. Wat gaat er nu precies verzameld worden (data)? Wat doet men met de dieren aan het eind (na afloop) van de proef? Wat is de wetenschappelijke read-out naast relapse? Graag begrijpelijke termen en read-out parameters benoemen in combinatie met specifieke stimuli van een context of een veranderde context. 6. Bijlage onderdeel I onderbouwing bijwerkingen: Noem hier ook mogelijke bijwerkingen van artemisinin bij ratten (tenminste tijdelijke hypoactiviteit of andere effecten, en neem deze mee in de tabel over ongeriefinschatting onderdeel K), bij meer dan 10% van de mensen komt dit voor staat in 3.1 achtergrond. Of krijgen de dieren geen onthoudingsverschijnselen? Dit moet worden toegevoegd. 7. Bijlage onderdeel L, Wat doet men met de dieren aan het eind (na afloop) van de proef? Verzameld en onderzoekt men het weefsel van de dieren (bv. verandering van expressie van GABAAR door artemisinin in verschillende hersenengebieden)? Zo ja, welke weefsels en welke data haalt men hieruit?

- Datum antwoord: 02-05-2020

- Strekking van de antwoord(en): 1. Is aangepast (looptijd nu 5 jaar). 2. Er is nog geen enkele evidentie voor de effectiviteit van artemisinin bij het onderdrukken van verslavingsgedrag (noch bij mensen, noch bij dieren). Daarom is een eerste proof-of-concept in een dierexperiment van groot belang om medisch-ethische toestemming te krijgen voor het testen bij verslaafden. Het werkingsmechanisme lijkt anders te zijn dan van benzodiazepines. Naar mijn weten zijn er geen anxiolytische effecten beschreven. 3. De wetenschappelijke en maatschappelijke relevantie is nog wat specifiekier beschreven in 3.3: Positieve resultaten van dit onderzoek zullen dus de basis vormen voor een vervolgaanvraag met klinische partners waarbij klinische trials bij mensen zullen worden aangevraagd. 4. Deze vragen zullen uiteindelijk in klinisch vervolgonderzoek moeten worden beantwoord. Reguliere behandeling van verslaving met medicijnen varieert van weken tot maanden en past vaak in een behandeltraject met meerdere vormen van therapie (bv cognitieve gedragstherapie). Onze studie is een eerste proof-of-concept studie naar de acute en subchronische effecten van artemisinin op een aantal belangrijke verslavingsparameters zoals motivatie en terugval. 5. De 'outcome/readout parameters' zijn in meer detail beschreven onder A. 6. Hypoactiviteit bij ratten is waargenomen bij doseringen van 50 en 100 mg/kg artemisinin (Amos et al., 2003; Brain Res. Bull.). Aangezien de door ons gebruikte doseringen veel lager liggen (3 - 10 mg/kg) is de kans hierop kleiner. Hypoactiviteit is niet gerapporteerd bij mensen als bijverschijnsel onder klinische doseringen. Wel zijn verlies van eetlust en misselijkheid gerapporteerd bij meer dan 10%. In de ratten zal dit worden gemonitord aan de hand van de gewichten van de dieren in de standaard welzijnsrapportage. Onthoudingsverschijnselen treden niet op onder de experimentele condities van zelftoediening zoals hier gebruikt. 7. Bij de dieren met een hersencanule zullen de breintjes worden verzameld om de injectieplaats te controleren. Deze experimenten zijn niet ontworpen om nog nadere moleculaire bepalingen te doen op het hersenweefsel. Hiervoor zouden additionele controlegroepen nodig zijn met dieren die geen artemisinin behandeling krijgen of die niet tweemaal getest worden op terugval (relapse). In

deze proof-of-concept studies staan de gedragseffecten centraal en daarop is het design gebaseerd.

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

Vraagronde 2

- Datum: 26-05-2020
- Strekking gestelde vragen: *De specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft zijn hieronder weergegeven: 1. In de antwoorden op de vragen van april geeft men aan dat het gaat om "een geregistreerd middel" (Artemisinin). Men vermeldt verder dat "een eerste proof-of-concept in een dierexperiment van groot belang is om medisch-ethische toestemming te krijgen voor het testen bij verslaafden." Voor de DEC blijft de vraag staan: Waarom is het noodzakelijk deze dierproeven uit te voeren? De DEC ziet graag dat dit verder onderbouwd wordt, geef informatie over waarom dit niet in mensen kan worden gedaan. De bijwerkingen en dosis zijn immers al bekend. Graag ziet de DEC dat men hierbij verwijst naar een formele opvatting van een METC, die zegt dat dierproeven noodzakelijk zijn om een onderzoek met artesimine op mensen te kunnen starten. 2. Men geef aan "onthoudingsverschijnselen treden in deze dierproef niet op". Als de dieren niet echt verslaafd zijn, hoe is dit dan translationeel naar de patiëntenpopulatie? 3. Men geeft aan dat er al middelen zijn voor nicotineverslaving. Als er al een middel is voor nicotine, Waarom is er dan nog een ander middel nodig? Welke andere aspecten bevat dit nieuwe middel?*
- Datum antwoord: 02-06-2020
- Strekking van de antwoord(en): *1. Ik heb begrepen dat de DEC de METc-AMC inmiddels al heeft geraadpleegd, maar dat daar geen eensluitend oordeel op is gekomen. Ik heb naar aanleiding hiervan contact gezocht een klinisch farmacoloog, hij vertelde me dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU. Helaas is in de EU geen artemisinine derivaat geregistreerd als een op zichzelf staand medicijn en zijn PO-formuleringen nog niet beschikbaar. Toch kan een proof-of-concept in een dierstudie de tijd en moeite die nodig is voor goedkeuring en implementatie van menselijke behandelingsprotocollen sterk verminderen. 2. Het optreden van onthoudingsverschijnselen wordt niet langer beschouwd als een voorwaarde voor substance use disorder/verslaving zoals geformuleerd in de DSM-5. Er lijkt ook geen relatie te bestaan tussen de ernst van de onthoudingsverschijnselen en het verslavende effect van een middel. Zo zijn de onthoudingsverschijnselen van nicotine relatief mild en die van opiaten behoorlijk sterk. Toch blijkt uit veel studies dat nicotine minstens zo verslavend is als heroïne. In onze studies richten we ons dan ook op de motivationele component en op cue-activiteit (craving), omdat deze parameters een grotere voorspellende waarde hebben voor terugval in verslavingsgedrag dan onthouding. 3. Momenteel is varenicline (Champix) het meest effectieve medicijn voor nicotineverslaving. Dit medicijn bleek effectief te zijn bij 30% van de gebruikers (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). Alle andere medische therapieën (bijv. Bupropion, nicotinevervanging) bleken minder effectief te zijn.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) : ja

Tijdens de eerste behandeling van de aanvraag door de DEC is de DEC tot de conclusie gekomen dat de noodzaak van de voorgestelde dierproeven voorsnog onvoldoende onderbouwd is en waarom het alternatief namelijk het direct testen van het middel op mensen niet mogelijk is. De DEC besluit dat de aanvraag en de beantwoording van vragen vanuit de DEC tot dusver onvoldoende handvatten biedt om van de urgentie van het proefdieronderzoek te overtuigen en dat daarom het maken van een afweging nog niet mogelijk is. De DEC heeft navraag gedaan bij een extern adviseur (een METC), maar kan op basis van deze feedback nog niet tot een oordeel komen.

De vraag van de DEC luidde: “..of deze dierproeven noodzakelijk zijn voor de goedkeuring door een METC of dat een geregistreerd geneesmiddel voor andere doeleinden in beginsel al direct in een klinische trial in mensen kan worden getest?”

Het antwoord van de externe METC luidde: “In antwoord op uw vraag: Bij een first-in-human clinical trial van een nieuw geneesmiddel moeten resultaten van dierproeven inzicht geven in de veiligheid en de werking/effectiviteit van het middel. Als een geneesmiddel al geregistreerd is, zijn gegevens omtrent veiligheid (zowel pre-klinisch als klinisch) bekend. Als het middel vervolgens voor een andere toepassing wordt getest dan waarvoor het geregistreerd is dient naar mijn mening een afweging gemaakt te worden. Op de eerste plaats dient een onderbouwing gegeven te worden waarom men verwacht dat het (geregistreerde) middel effectief is bij de nieuwe indicatie. Dit kan zijn op basis van het werkingsmechanisme van het middel (theorie), toevallige waarnemingen gedaan bij klinische toepassing van het middel (empirisch), maar ook uit resultaten van proefdieronderzoek. Daarnaast dient men rekening te houden met de belasting/eventuele risico's van de uit te voeren klinische trial. Gaat het om een eenmalig toediening van een middel of moet dit gedurende langere tijd gebruikt worden. Daarbij dient men een inschatting te maken hoe groot de kans is dat bijwerkingen optreden. Ik stel me voor dat voor een eenmalige toediening van een middel (in een gebruikelijke dosering) geen extra informatie uit proefdieronderzoek nodig is. Bij een middel met grote kans op bijwerkingen of dat langdurig gebruikt gaat worden geeft proefdieronderzoek meer onderbouwing voor een afweging van de benefit/risico verhouding van de trial. Samengevat: medisch-ethisch gezien zijn dierproeven niet strikt noodzakelijk, maar voor goedkeuring door de METC dient wel een goede onderbouwing voor de veiligheid en effectiviteit gegeven te worden”.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project 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. (geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project).

C. Beoordeling (inhoud)

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

De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Onduidelijk hierbij is ten eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij een reeds geregistreerd geneesmiddel en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn. In dat laatste geval moet sprake zijn van geschikte vervanging. Van belang is dat een METC de extrapolatiebaarheid van de resultaten naar de humane situatie in dit geval als feitelijk voldoende inschat. Zo niet, dan vervalt de translationele waarde van de dierproeven en daarmee tevens weer de noodzaak in verband met de klinische toepassing. De DEC heeft naar aanleiding van de zorgen hierover navraag gedaan bij een extern adviseur (een METC), maar kan op basis van deze feedback nog niet tot een oordeel komen.

Na navraag van de onderzoekers bij een klinisch farmacoloog blijkt dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU.

Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is. De DEC is er 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.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming): *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is om te onderzoeken of het middel artemisinine een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden.*

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.

Het directe doel van deze studie is te onderzoeken of het middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen is verslaving.

Een belangrijk kenmerk van verslaving is de voortdurende compulsieve drang om het (stimulerende) middel te gebruiken ondanks het feit dat de gebruiker zich bewust is van de schade die het berokkent. Een andere belangrijke factor is de terugval in gebruik na abstinentie, veroorzaakt door blootstelling aan middel-geassocieerde omgevingsprikkelers. De huidige medicamenteuze behandelingen tegen verslaving zijn onvoldoende effectief. In dit onderzoek onderzoekt men de effecten van de werkzame stof artemisinin, in het kader van een mogelijke behandeling van verslaving, zowel gebruik als terugval.. De basis voor dit doel is gelegen in aanwijzingen dat artemisinin kan interfereren in het mechanisme van GABAerge neurotransmissie waarvan bekend is dat het een rol speelt in verslaving.

Het uiteindelijke doel van deze studie is om nieuwe (aangrijpingspunten voor) medicatie te ontdekken die verslavingsgedrag zullen onderdrukken, en daarmee de lasten voor de maatschappij verlichten. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.

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 zijn de: proefdieren, de onderzoekers en de verslaafde patiënten, de maatschappij. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast en de dieren zullen ingrepen en handelingen ondergaan die ongerief veroorzaken. De waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: Het project kan gezien worden als een proof of concept onderzoek en kan in zeer beperkte mate tot meer fundamenteel-wetenschappelijke kennis leiden. De waarden die voor patiënten bevorderd worden: De preklinische diermodellen zullen de weg naar nieuwe behandelstrategieën voor humane

toepassing verkleinen en in de toekomst de gezondheid van patiënten (verslaafden) verbeteren, dit heeft een positieve invloed op de maatschappij.

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

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.

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 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 collega's in de academische wereld en andere instituten.

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.

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. Het project bevat 1 appendix. Er is een duidelijk keuzemoment ingebouwd, pas wanneer er een duidelijke effectiviteit van artemisinin wordt gevonden in de eerste experimenten (nicotine) of tweede serie experimenten (opioïde) zal men verder gaan met de vervolgentexperimenten. Dit is voor de DEC een belangrijk gegeven gezien de, in de ogen van de DEC, zwakke wetenschappelijke onderbouwing van de geclaimde interferentie van artemisinin van het GABAerge systeem in neuronen. Alleen indien er duidelijke aanwijzingen zijn dat de stof werkzaam is, is naar opvatting van de DEC vervolgonderzoek zinvol; de ingebouwde beslispunten geven deze garantie.

De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, kennis kan worden verkregen over verslavingsgedrag. De nieuw verkregen inzichten kunnen op lange termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van verslaving aan nicotine en opioïden. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

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. Er wordt adequate verdoving/pijnbestrijding toegepast. De dodingsmethode is volgens de bijlage IV richtlijn.

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 2010/63/EU.

Na de operatie worden de dieren alleen gehuisvest (voor ongeveer 10 weken). Dit is nodig vanwege mogelijke interferentie met de hechtingen, katheter en intracraniale canule na de operatie, door de ratten in dezelfde kooi.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geëvalueerd. Licht uw beoordeling toe.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geëvalueerd.

Alle dieren (100%) in deze projectaanvraag ondergaan naar verwachting matig ongerief. Matig ongerief ontstaat als gevolg van de operaties (plaatsen van katheter en intracraniale canule) en door het individueel huisvesten. Licht ongerief ontstaat als gevolg van zelf-administratie van nicotine of opiaten tijdens de gedragstesten. Daarnaast zorgen de injecties, infusies en het doden voor licht ongerief.

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.

De integriteit van de dieren zal onder andere worden aangetast door de operaties, individueel huisvesten, zelf-administratie van verslavende middelen en het doden van de dieren aan het eind van de proef.

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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd en er is goed ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.

De criteria zijn hieronder weergegeven:

- Verlies van lichaamsgewicht: $\geq 15\%$ in een periode van 24 uur
- Onbeweeglijkheid
- Slechte vachtconditie: tekenen dat de rat niet de vacht verzorgt, wat meerdere dagen aanhoudt
- Tremoren / convulsies: door beschadigde intracraniale canule
- Zelfbeschadiging: na een operatie of als gevolg van effecten van heroïne of artemisinin
- Abnormale lichaamshouding: elke indicatie dat de rat een blessure heeft opgelopen waardoor hij gedurende langere tijd niet in staat is zijn normale lichaamshouding te behouden

De kans dat de dieren een humaan eindpunt bereiken is kleiner dan 2%.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

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.

Binnen de DEC was discussie of dierproeven nodig zijn wanneer een geregistreerd medicijn off label wordt ingezet voor een andere indicatie. Daarover is extern advies ingewonnen. Bij navraag blijkt dat er in de EU geen geschikt geregistreerd middel is dat alleen de werkzame stof artemisinin bevat. De middelen die op de markt zijn, betreffen combinatiepreparaten en zijn niet orale vorm verkrijgbaar, zie de vragen van de DEC aan de aanvragers. Het was dus in alle waarschijnlijkheid niet mogelijk om met behulp van een reeds voor een andere indicatie geregistreerd medicijn klinische trials bij mensen te doen om de effectiviteit van artemisinin bij verslaving te testen. Tijdens de afweging is dit voor de DEC een groot dilemma geweest of er in het voorliggende geval inderdaad onvoldoende onderbouwing was voor het uitvoeren van een clinical trial en dat hiervoor eerst dierproeven noodzakelijk zijn. In het voorliggende geval is de DEC na het inwinnen van informatie uiteindelijk tot de opvatting gekomen dat dierproeven in alle waarschijnlijkheid een eerste noodzakelijke stap zullen zijn voorafgaand aan een clinical trial (zie ook dilemma). Bovendien bleek na beantwoording van de vragen dat er op dit moment ook nog geen overtuigend wetenschappelijk bewijs is dat artemisinin werkzaam zou zijn bij verslaafde patiënten. De DEC onderschrijft de route dat het onderzoek wordt dus ingezet om eerste een proof-of-concept bij dieren te verkrijgen, waarna mogelijke klinische trial bij mensen een volgende stap zou kunnen zijn. Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.

De keuze voor het gebruik van rat modellen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Het gebruikte diermodel beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. De rat is de meest gebruikte diersoort voor dergelijke verslavingsexperimenten, zodat een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk is.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

Een statistische toets wordt gebruikt om het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken. Na de eerste serie van experimenten vindt er een afweging plaats, de vervollexperimenten zullen alleen plaatsvinden als er een positief resultaat wordt gevonden in de eerste serie experimenten. 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 448 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.

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.

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.

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en dierverzorgers uitgevoerd. Mochten er onvoorziene complicaties optreden die meer dan matig ongerief veroorzaken dan wordt het experiment onmiddellijk beëindigd en het dier gedood.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

Men zal tijdens dit onderzoek dieren van beide geslachten gebruiken.

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.

Voor de analyse van weefsel is het nodig de dieren te doden. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

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?

De niet-technische samenvatting is na de aanpassing een evenwichtige weergave van het project. 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*).

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over of de stof artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden het gebruik van 448 ratten in deze dierproef die daarvan 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 aanzienlijk nadeel voor deze proefdieren. De waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden zijn: beperkt voordeel vanwege de kennisontwikkeling en het mogelijk ontwikkelen van een proof-of-concept. Deze kennis kan ook gebruikt worden in andere wetenschapsgebieden zoals verslavingsonderzoek. 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 nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van nicotine en opioïden verslaving. De huidige mogelijkheden hiervoor zijn beperkt.

De DEC is van mening dat de lange termijn belangen van de patiënten (en de samenleving) in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 448 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden en tijdens de proef matig ongerief ondervinden.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over hoe artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis over en geneesmiddelen voor de behandeling van verslaving, is afgewogen tegen het, als 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 448 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 maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over of artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Inzichten in het mogelijke werkingsmechanisme zullen niet worden verkregen.

(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 behandelstrategieën zullen worden ontwikkeld. 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 naar het oordeel van de DEC het, als substantieel te kwalificeren, maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek opweegt tegen het gebruik van maximaal 448 ratten en het daarbij verwachte 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 een meerderheidsstandpunt.

Eén lid gaat niet mee. Dit lid is van mening dat het beginnen met verslavende middelen een keuze is die de mens zelf doelbewust maakt. Tevens is zij van mening dat terugvallen in verslaving ook met alternatieven aan te pakken is en dat nieuw onderzoek met proefdieren niet nodig is. Het ongerief bij de dieren weegt voor dit lid niet op tegen de belangen van het onderzoek. Een tweede lid schaart zich achter het meerderheidsstandpunt maar is van opvatting dat de gepresenteerde wetenschappelijke onderbouwing waarom artemisinin een rol zou kunnen spelen in verslaving niet erg overtuigend is; echter de ingebouwde beslismomenten geven voor dit lid voldoende garantie dat er geen verdere proeven worden gedaan indien blijkt dat er geen resultaten zijn die op effectiviteit wijzen.

De andere leden zijn van mening dat de belangen van het onderzoek opwegen tegen het maximaal matig ongerief dat teweeg wordt gebracht bij de dieren, maar onderkennen wel de hierna volgende dilemma's.

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).

De DEC heeft bij de beoordeling van dit project wel een dilemma geconstateerd. Enerzijds het doen van onderzoek naar mogelijke behandelmethoden van verslaving, waarvoor dierproeven worden gedaan, en anderzijds de 'vrije wil' om te beginnen met het gebruik van verslavende middelen. Verslaving aan nicotine en opioïden is een maatschappelijk vraagstuk, waarbij men, in het algemeen, begint te gebruiken uit 'vrije wil'. Echter het is duidelijk dat er niet bij iedereen sprake is van een 'vrije keuze'. Denk hierbij aan adolescenten, mensen die een verhoogde neiging tot impulsiviteit en compulsiviteit hebben of lijden aan een psychiatrische stoornis zoals schizofrenie. Ook spelen sociaal-economische factoren een rol bij het ontwikkelen van en het afkomen van een verslaving. Bij kwetsbare groepen en gevoelige mensen kan een behandeling noodzakelijk zijn om definitief van een verslaving af te komen, daaraan kan dit onderzoek op termijn een bijdrage leveren. Het is duidelijk dat ook preventieve maatregelen een rol moeten krijgen: Het is de taak van ouders en de overheid om ervoor te zorgen dat deze kwetsbare en gevoelige mensen niet in aanraking komen met dergelijke verslavende middelen. Door maatregelen te nemen zou het doen van onderzoek met dierproeven, om een behandeling tegen verslaving te vinden, wellicht minder noodzakelijk zijn. Omdat nicotine overal vrijelijk te verkrijgen zijn voor mensen ouder dan 18 jaar, én er op dit moment onvoldoende inzicht is in alle kwetsbare groepen, is er geen basis om dit vanuit de overheid gestalte te geven met afdoende preventieve maatregelen. Dit geldt echter niet voor opioïden.

Een ander vraagstuk is het doen van dierproeven met werkzame stoffen die reeds als geregistreerd medicijn (voor andere indicaties) op de markt zijn. Er lijken geen duidelijke richtlijnen te bestaan voor de vraag of het bij het off label toepassen van medicijnen het wettelijk, medisch of ethisch noodzakelijk is om eerst dierproeven te doen. Wanneer de veiligheid van een middel reeds is bewezen bij de registratie van het geneesmiddel, dan zou het middel in principe (met informed consent) ook direct ingezet kunnen worden in clinical trials voor mensen en kunnen (nieuwe) dierenproeven wellicht

achterwege blijven. Om een overwogen besluit te kunnen nemen zou een samenspraak met een METC noodzakelijk zijn, om het alternatief, een voorstel voor een clinical trial, te onderzoeken en om op basis daarvan de conclusie te kunnen trekken, namelijk dat er voor de dierproeven al of niet een alternatief beschikbaar is.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 10.2 .e. en g 20209667
Bijlagen
3

Datum 24 augustus 2020
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 9 april 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" met aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 0209667. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 24 augustus 2020 tot en met 31 juli 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2 .e. en g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 10 juli 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 26 mei 2020 en 10 augustus 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de noodzaak van dierproeven voor het behalen van de onderzoeksdoelen, de 3V's en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

24 augustus 2020

Aanvraagnummer:

AVD 20209667

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

24 augustus 2020

Aanvraagnummer:AVD  20209667

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2 .e. en g

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 augustus 2020 tot en met 31 juli 2025, voor het project "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" met aanvraagnummer AVD^{10.2 .e. en g} 20209667, na advies van dierexperimentencommissie DEC^{10.2 .e. en g}. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar, sectiehoofd.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 9 april 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 10 juli 2020;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 18 augustus 2020;
 - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 10 juli 2020
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 2 juni 2020, 18 augustus 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures			
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	448	100,0% Matig

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD XXXXXXXXXX 20209667

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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 onvermijdelijk 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

Aanvraagnummer:AVD  20209667

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.



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 | Vul uw | 11500 |
| .1 | deelnemersnummer van de | |
| | ^{NVVA/A} in | |
| 1 | Vul de naam van de | UMC Utrecht |
| .2 | instelling of organisatie in. | |
| 1 | Vul de titel van het | Verbindingen tussen de grote en kleine hersenen en de invloed van |
| .3 | project in. | vroege hersenschade |

2 Categorie van het project

- | | | |
|----|--|---|
| 2 | In welke categorie valt | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| .1 | het project. | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| | | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier |
| | | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding |
| | | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek |
| | | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

3 Algemene projectbeschrijving

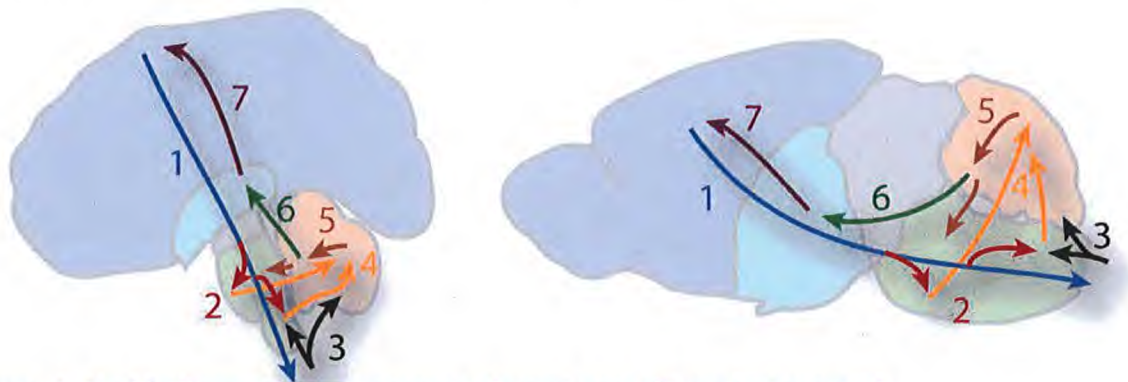
3.1 Achtergrond

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 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Algemene introductie en hoofddoel

De ontwikkeling van onze hersenen vindt plaats vóór en na de geboorte. Voor de geboorte worden hersenstructuren aangelegd en verbindingen geïnitieerd. Na de geboorte vindt verfijning plaats van structuren en de verbindingen daartussen. **Hersenschade tijdens of rondom de geboorte heeft tot gevolg dat verfijning van verbindingen niet goed verloopt met hersenaandoeningen tot gevolg** (Ribeiro Gomes et al., 2019; Stanfield et al., 1982; Welniarz et al., 2017). Vroege hersenschade in de kleine hersenen (cerebellum) is bijvoorbeeld geassocieerd met de ontwikkeling van autisme (Badura et al., 2018; Wang et al., 2014) en epilepsie (Erickson et al., 2007; Fletcher et al., 1996; Kros et al., 2015), terwijl schade van motor centra in de grote hersenen (cerebrum) is geassocieerd met de ontwikkeling van cerebrale parese (Dinomais et al., 2015; Rumajogee et al., 2016; Wagenaar et al., 2018) en cognitieve problemen (Armstrong-Wells et al., 2014; Grunt et al., 2015; Wagenaar et al., 2018). Alhoewel het bekend is dat schade in cerebellum leidt tot een verstoorde werking in het cerebrum en vice versa, is het echter nog onbekend hoe de ontwikkelende verbindingen tussen deze structuren bijdragen aan deze aandoeningen. Bovendien lijken veel van deze aandoeningen op elkaar, waarbij de locatie van schade vaak geen goede voorspeller is voor de aard van de aandoening. Met andere woorden; cognitieve defecten komen voor bij zowel cerebrale als cerebellaire schade. Hetzelfde geldt voor problemen met de motoriek. **Dit suggereert dat de verbindingen tussen het cerebrum, het cerebellum en de rest van het brein cruciaal zijn voor verschillende functies.** Er is echter volledig onbekend welke specifieke verbindingen welke taken ondersteunen (b.v. cognitief functioneren en controle van bewegingen) en hoe de ontwikkeling van deze verbindingen elkaar beïnvloedt.



Figuur 1: Verbindingen in de hersenen relevant voor dit projectvoorstel.

Schematische weergave van de menselijke hersenen (links) en muizenhersenen (rechts) met vergelijkbare hersenstructuren en verbindingen. De grote hersenen (blauwe structuur links boven in beide breinen) maken verbindingen met de rest van de hersenen. Het cerebellum (geel) is verbonden met de hersenstam (groen) en met de thalamus (lichtblauw). Er zijn een groot aantal verbindingen tussen deze structuren. De grote hersenen projecteren direct naar het ruggenmerg (1), maar geven in dit pad ook verbindingen naar de pons en hersenstam (2). Vanuit het ruggenmerg is er input naar de hersenstam en het cerebellum (3). Vanuit de hersenstam en pons zijn er verbindingen naar het cerebellum (4). Vanuit het cerebellum gaan projecties naar de hersenstam (5) en naar de thalamus (6). Vanuit de thalamus komt een verbinding naar de grote hersenen (7) die de cirkel rond maakt.

Er zijn vele verbindingen binnen het humane brein, en deze verbindingen vinden we ook terug in het muizenbrein (Figuur 1). Deze verbindingen zijn voor de werking van het brein essentieel om informatie uit ons lichaam en onze omgeving te verwerken en om controle uit te oefenen op ons lichaam. Als we kijken naar de controle van bewegingen, dan nemen de grote hersenen een belangrijke plaats in. De motor cortex controleert bewegingen en hiertoe lopen er verbindingen vanuit de grote hersenen direct naar het ruggenmerg (1, blauwe pijl in Figuur 1) richting de zenuwen die de spieren aansturen. Om andere hersengebieden die ook de stand van het lichaam controleren van informatie te voorzien, wordt er een kopie gemaakt van de informatie die naar het ruggenmerg gestuurd wordt, en naar de pons en

andere kernen in de hersenstam gestuurd (2, rode pijlen in Figuur 1). Vanuit het ruggenmerg komt er informatie over de stand van het lichaam naar de pons en andere kernen in de hersenstam (b.v. de positie van ledematen, registratie van aanraking; 3, zwarte pijlen in Figuur 1). Vervolgens sturen de pons en andere hersenstamkernen deze informatie weer door naar het cerebellum (4, oranje pijlen in Figuur 1), waardoor het cerebellum dus informatie vanuit het ruggenmerg en vanuit de grote hersenen ontvangt. Output vanuit de kleine hersenen gaat vervolgens terug naar de hersenstam en naar bijvoorbeeld specifiek naar de pons (5, bruine pijlen in Figuur 1), maar er gaat ook output vanuit de kleine hersenen terug naar het cerebrum via de thalamus (6, groene pijl in Figuur 1). Vanuit de thalamus gaat deze informatie vanuit het cerebellum terug naar de grote hersenen (7, paarse pijl in Figuur 1).

Binnen dit circuit zijn dus verschillende verbindingen essentieel om een optimale motoriek te verzorgen. Deze verbindingen zijn ook essentieel voor andere hersenfuncties, zoals cognitie en sociale interactie.

In het hier voorgestelde onderzoeksproject gaan wij de anatomie en fysiologie van deze verbindingen in verschillende ontwikkelingsstadia bestuderen. Wij zullen ons focussen op een 6 tal verbindingen die onder te verdelen zijn in 'input naar het cerebellum' en 'output van het cerebellum':

Tabel 1: Overzicht van de te testen verbindingen.

Inputs naar (boven) en outputs van (onder) het cerebellum zullen worden onderzocht.

Input naar het cerebellum

- 1) Cerebrum --> Pons --> cerebellum
- 2) Cerebrum --> andere hersenstam kernen --> cerebellum
- 3) Ruggenmerg --> Cerebellum

Output van het cerebellum

- 4) Cerebellum --> Pons
- 5) Cerebellum --> andere hersenstam kernen
- 6) Cerebellum --> thalamus
- 7) Thalamus --> Cerebrum

Deze input en output paden van het cerebellum zijn tot nu toe alleen onderzocht op grof anatomisch niveau en alleen in volgroeide dieren en mensen. Het is daarom op dit moment nog onbekend

- (1) hoe de ontwikkeling verloopt van de verbindingen van en naar het cerebellum,
- (2) wat het effect van verstoorde ontwikkeling is op deze verbindingen
- (3) hoe de verschillende inputs worden verwerkt door hersenstam (inclusief pons) en thalamus,
- (4) wat de rol is van het cerebellum bij het reguleren van motoriek, cognitie en sociale interactie

Met het beantwoorden van deze vragen trachten wij ons uiteindelijke doel te behalen: een causale en mechanistische verklaring op te stellen voor gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade in deze hersenverbindingen.

Inbedding met andere onderzoekslijnen

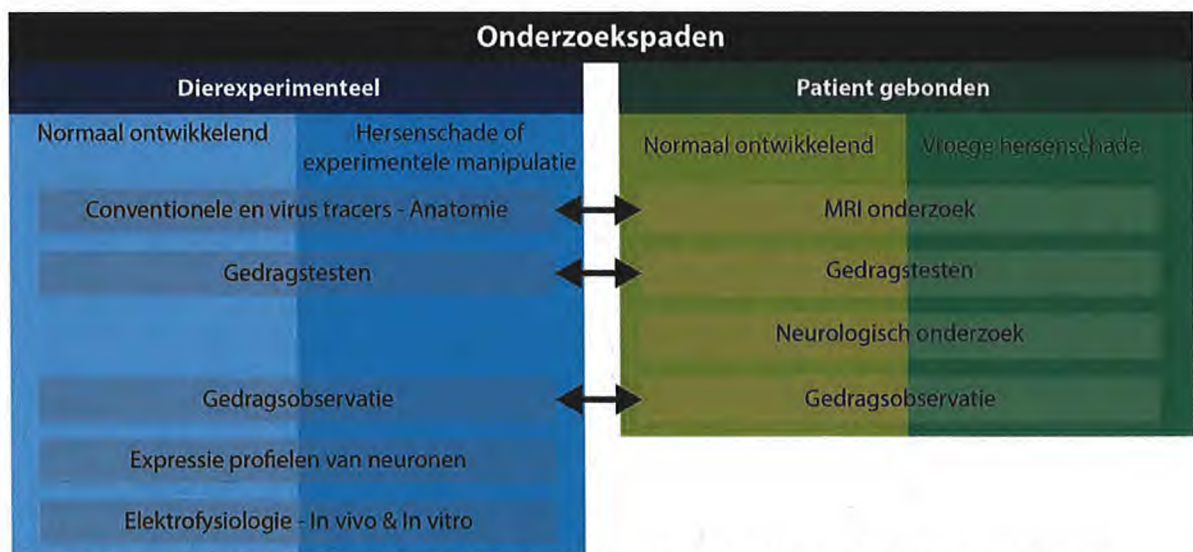
Omdat de ontwikkeling van de hersenen van zoogdieren sterk op elkaar lijkt (Figuur 1, Butler et al., 2005), en omdat de schademodelen in de muis lijken op de schade die kan optreden rond de geboorte bij de mens, kunnen we uitkomsten uit ons dieronderzoek direct relateren aan ontwikkelende kinderen (Figuur 2, pijlen). Daarom zal er tegelijkertijd met het hier voorgestelde dierexperimenteel werk een scala aan mens-gebonden onderzoek worden gedaan (Figuur 2, groen). Met behulp van MRI zullen hersenverbindingen van en naar het cerebellum worden gevisualiseerd in humane neonaten met en zonder hersenschade om zo het effect van vroege hersenschade op de algehele ontwikkeling van de hersenen van kinderen vast te stellen. Ook zal er gedrags- en neurologisch onderzoek plaatsvinden in deze patiëntenpopulatie en in gezond ontwikkelende kinderen om zo grof het verband vast te stellen tussen de hersenanatomie enerzijds en de ontwikkeling en gedrag van de kinderen anderzijds. Binnen de

afdeling neonatologie, waarmee onze afdeling al jaren intensief samenwerkt, is dit patiëntgebonden onderzoek onderdeel van de standaard zorg. **Voor een deel lopen deze onderzoekslijnen al. In een kleine populatie patiënten hebben we al kunnen vaststellen dat de verbinding tussen de grote hersenen en de hersenstam is aangedaan na vroege cerebrale schade. Ook hebben we al kunnen vaststellen dat er vervolgschade op kan treden aan het cerebellum na vroege schade aan de grote hersenen. Voor bewegingsonderzoek zijn we op dit moment bezig met pilotdata verzamelen om bewegingsafwijkingen vast te kunnen stellen in de patiëntenpopulatie. Hiervoor wordt op dit moment een METC-aanvraag voorbereid.**

De inzichten uit dit patiëntgebonden onderzoek zullen vervolgens tot dierexperimenteel onderzoek leiden. De geobserveerde pathologie in muismodellen voor vroege hersenschade (modellen toegepast binnen onze onderzoeksgroep onder CCD AVD115002016751) is zeer goed te vergelijken met de pathologie gezien in humane pasgeborenen. In het verleden zijn motorische taken gedaan met deze muizen zoals de cylinder rearing test. Hieruit blijkt dat motorische afwijkingen vergelijkbaar zijn tussen mens en muis, maar andere gedragingen zijn niet of nauwelijks onderzocht. Dit is dus ook een doel van dit onderzoek.

Binnen deze muismodellen en bij experimentele manipulaties van hersenverbindingen gaan we specifiek kijken naar de functie en ontwikkeling van een hersenverbinding van of naar het cerebellum. Inzichten uit dit dierexperimenteel onderzoek zullen vervolgens worden gebruikt om specifiek en doelgerichter onderzoek te verrichten in patiënten (Stoodley et al., 2017, Figuur 2). Inzichten uit deze combinatie van onderzoek zal uiteindelijk, in de toekomst leidend kunnen zijn voor nieuwe therapeutische interventies aan patiënten.

Het onderzoeksinstituut waar dit onderzoek uitgevoerd zal worden heeft voor beide paden van onderzoek brede mogelijkheden en een uitstekende onderzoekstructuur. Binnen beide paden van onderzoek zullen experts op hun eigen vakgebied werken en communiceren binnen een breed multidisciplinair team. Dit zorgt er voor dat inzichten vanuit een pad snel gedeeld kunnen worden over het gehele team.



Figuur 2: Twee onderzoekspaden: Dierexperimenteel en patiënt gebonden onderzoek.

Dierexperimenteel onderzoek en patiëntgebonden onderzoek versterken elkaar doordat ze direct aan elkaar te relateren zijn. Zowel binnen dierexperimenteel en patiënt gebonden onderzoek kunnen we anatomie en gedrag onderzoeken (horizontale dubbele pijlen). Slechts de exacte methodologie verschilt (bv binnen muisonderzoek kunnen we de dieren op groot anatomisch niveau analyseren doormiddel van injecties met tracers. Binnen patiënten kunnen we slechts MRI en in hoge uitzondering postmortem onderzoek doen zonder tracers.)

Binnen patiënt onderzoek (groen) worden normaal ontwikkelende kinderen vergeleken met kinderen met vroege hersenschade via MRI, gedragstesten, gedragsobservatie en neurologisch onderzoek. Binnen dierexperimenteel onderzoek (blauw) zullen we normaal ontwikkelende muizen (linkerkolom,

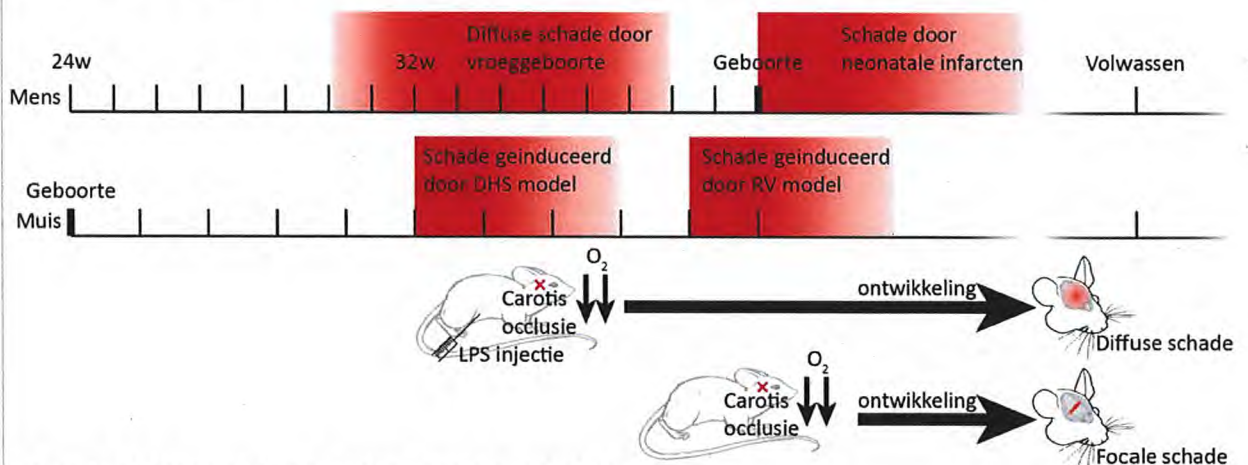
lichtblauw) vergelijken met muizen met vroege hersenschade, muizen waarin we specifieke hersenverbindingen uitschakelen door axonen of neurotransmitter release van synapsen te ableren, of muizen waarin we de activiteit van specifieke hersenverbindingen moduleren (tweede kolom, donkerblauw). Deze muizen worden vergeleken op basis van anatomie (bovenste), gedrag (tweede en derde rij), expressie van bepaalde genen (vierde rij), en aan de hand van elektrofysiologische metingen (laatste rij). Anatomische en gedragsmaten kunnen direct vergeleken worden tussen dierexperimenteel en patiëntgebonden onderzoek (horizontale dubbele pijlen).

Klinisch relevante muismodellen

Voor een goede vergelijking tussen de patiënten en het dieronderzoek mogelijk te maken, maken we gebruik van twee muismodellen voor vroege hersenschade. Ten eerste gebruiken we het Rice-Vannucci model (RV model, Figuur 3, Nguyen et al., 2015; Rice et al., 1981), dat vroege hersenschade simuleert door bij muizenpups op postnataal dag 9 (P9) een carotis occlusie uit te voeren, gevolgd door systemische hypoxie. Deze combinatie zorgt voor focale hersenschade vergelijkbaar met wat gezien wordt in voldragen neonatale patiënten met asfyxie (zuurstofgebrek) of een arterieel ischemisch infarct. Dit model wordt al >35 jaar wereldwijd gebruikt (waaronder 20 jaar in onze eigen onderzoeksgroep in Utrecht, zie ook CCD AVD115002016751) om dit type hersenschade bij voldragen pasgeborenen te onderzoeken.

Om het effect van diffuse witte stof hersenschade zoals voorkomt bij (extreem) te vroeg geboren kinderen op de ontwikkeling te onderzoeken gebruiken we een model waarbij er op P5 een carotis occlusie uitgevoerd wordt, gevolgd door systemische hypoxie en een injectie met lipopolysacchariden (LPS) afkomstig van E.Coli (Shen et al., 2012; van Tilborg et al., 2017, 2018). Deze combinatie van interventies op dit moment in de hersenontwikkeling zorgt voor een activatie van het immuunsysteem en veroorzaakt diffuse witte stof hersenschade (diffuse hersenschade: DHS model, Figuur 3) vergelijkbaar met DHS geobserveerd te vroeg geboren patiënten. Dit model wordt sinds 5 jaar succesvol in onze onderzoeksgroep gebruikt (zie ook CCD AVD115002016751).

Binnen een nest van dieren zal er gerandomiseerd worden door bij de helft van de pups één van de bovenstaande operaties uit te voeren en bij deel van het nest een sham-ingreep waarbij alle handelingen worden doorlopen, maar geen vaten afgeklemd worden, en de dieren worden niet aan hypoxie blootgesteld en/of krijgen geen LPS toegediend. Hierdoor hebben we voor beide modellen dus een controlegroep binnen de eenheid van het nest. Beide modellen worden al jarenlang binnen het lab gebruikt en er is veel ervaring met het gebruik van deze modellen voor onderzoek.



Figuur 3: Muismodellen voor vroege hersenschade

De ontwikkeling van de hersenen van de mens en de muis is vergelijkbaar, alleen het moment van geboorte is anders; muizen worden eerder geboren dan mensen (boven); het derde trimester zwangerschap van de mens komt overeen met de eerste 10 postnatale dagen van de muis qua hersenontwikkeling. Bij de mens kan er vroege hersenschade optreden bij bijvoorbeeld vroeggeboorte (muis ca P5), of hersenschade door neonatale infarcten (zuurstofgebrek bij

voldragen geboorte, muis ca P9). Voor beiden patiëntenpopulatie is een muismodel beschikbaar (zie boven): het DHS model simuleert diffuse schade door vroeggeboorte, terwijl het RV model focale schade door zuurstofgebrek tijdens de voldragen geboorte simuleert.

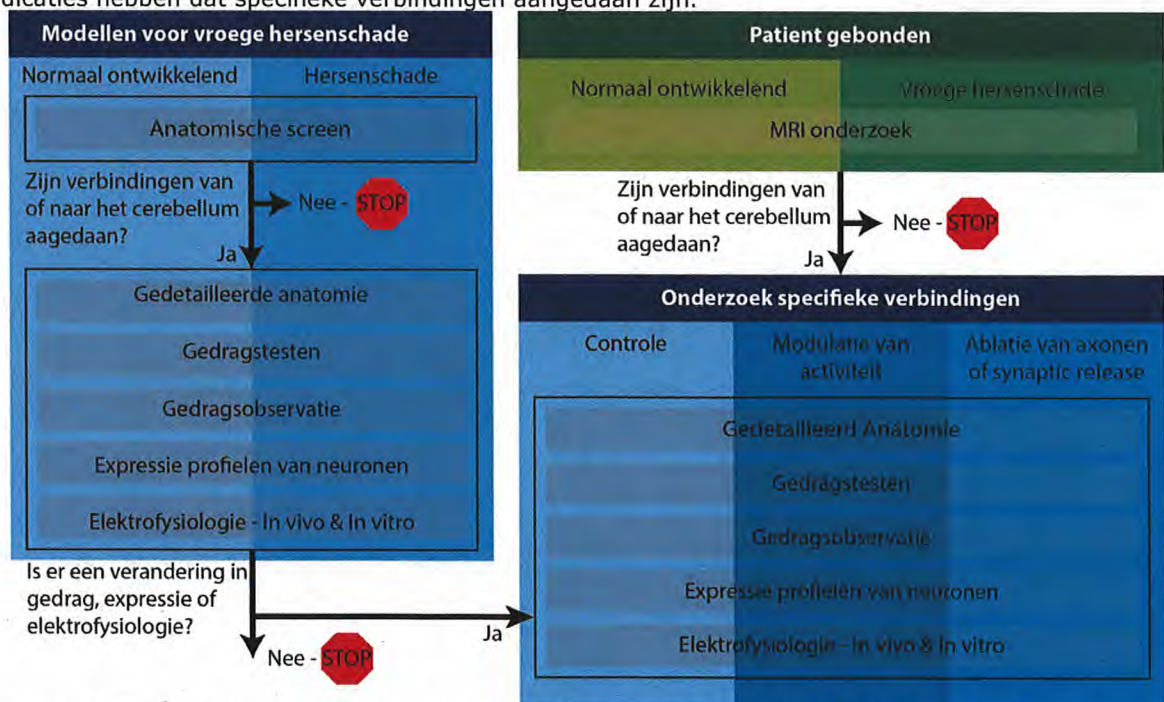
Binnen deze muismodellen kijken we eerst naar veranderingen van hersenverbindingen op anatomisch niveau. Indien daar veranderingen te detecteren zijn, gaan we die verbindingen verder onderzoeken op gedrags-, genetisch en elektrofysiologisch niveau. Dit go-no go moment staat aangegeven in Figuur 4.

In feite geven de muismodellen voor vroege hersenschade en anatomisch onderzoek in patiënten slechts indicaties van hersenverbindingen die aangedaan kunnen zijn, en geven ze slechts een indicatie hoe die verbindingen aangedaan zijn. Maar of een verandering in een verbinding noodzakelijk is voor een defect, en of een verandering in een verbinding voldoende verklaring is voor de veranderingen (dus een causaal verband) is uit deze experimenten niet op te maken. Hiervoor moeten we specifieke hersenverbindingen manipuleren en moeten we de uitkomsten hiervan vergelijken met uitkomsten verkregen onder het schademodel. Hierin is het ook belangrijk om de activiteit van neuronen te meten door middel van elektrofysiologie omdat dit inzicht geeft in hoe exact verbindingen aangedaan zijn op functioneel niveau, wat een indicatie kan geven voor eventueel effectieve interventies, en het levert fundamentele inzichten op in het functioneren van de hersenen en verbindingen in de hersenen. Ook zijn expressieprofielen van neuronen in dit verband belangrijk omdat het informatie geeft over welke processen in neuronen aangedaan zijn. Dit geeft weer een indicatie voor welke medicijnen eventueel effect zouden kunnen hebben om die processen weer te normaliseren.

Manipulatie van specifieke hersenverbindingen in muizen

Specifieke verbindingen die zijn aangedaan binnen bij dieren met geïnduceerde hersenschade worden vervolgens verder onderzocht door die specifieke verbindingen te moduleren door (a) activiteit in deze verbindingen te moduleren, door (b) de axonen te ableren, of door (c) neurotransmitter release uit deze verbindingen stil te leggen.

Naast de lijn van onderzoek waarbij we op basis van de schademodellen in dieren verbindingen identificeren, gaan we deze onderzoeksmethoden ook direct inzetten als we vanuit patiëntonderzoek indicaties hebben dat specifieke verbindingen aangedaan zijn.



Figuur 4: Twee sets van dierexperimenten direct gelinkt aan klinische inzichten.

Onze projectopzet gaat uit van klinische inzichten (groen kader). MRI onderzoek in patiënten met

hersenschade (donkergroen), vergeleken met normaal ontwikkelende controles (lichtgroen) geven inzicht in welke gebieden er aangedaan zijn en welke projecties vanuit deze gebieden afwijkingen vertonen in patiënten. Indien de cerebrale schors aangedaan is, kan dit gesimuleerd worden in het RV model (links). Een set experimenten binnen dit muismodel is er op gericht om allereerst vast te stellen welke verbindingen binnen dit muismodel zijn aangedaan (anatomische screen). Alleen als er een verbinding is aangedaan op anatomisch niveau worden er experimenten uitgevoerd om verschillen in gedrag, gen expressie en elektrofysiologie te detecteren.

Indien een verbinding is aangedaan in een patiëntenpopulatie, dan gebruiken we moleculaire technieken om specifiek deze verbinding te onderzoeken (rechts). Bij deze experimenten kijken we direct naar anatomie, gedrag, gen expressie en elektrofysiologie omdat verwacht wordt dat de anatomische effecten van veel experimentele manipulaties minimaal zal zijn.

Verwachte uitkomsten en implementatie in de kliniek

We verwachten verschillende uitkomsten uit dit onderzoek. Ten eerste is er het fundamentele karakter van dit project waarbij fundamentele inzichten verkregen worden over de ontwikkeling van de hersenen en over specifieke hersenverbindingen. Ook zijn er nieuwe inzichten te verwachten met direct klinische implicatie: inzichten uit dit onderzoek kan leiden tot nieuwe manieren van diagnostiek of interventies bij patiënten.

Dit onderzoek richt zich op het verkrijgen van fundamenteel inzicht in de ontwikkeling van de hersenen. De ontwikkeling binnen hersengebieden is reeds grof in kaart gebracht (Boswinkel et al., 2019; Hortensius et al., 2018), terwijl er zeer weinig bekend is over de ontwikkeling van verbindingen tussen hersengebieden (Pieterman et al., 2017). Juist in deze verbindingen is nu dus veel winst voor patiënten te behalen, zeker gezien het steeds duidelijker wordt dat de verbindingen tussen hersengebieden een grote rol spelen bij de regulatie van gedrag (Musall et al., 2019). Ons project zal fundamentele inzichten geven in de ontwikkeling van de hersenen in het algemeen, maar vooral ook in de ontwikkeling van verbindingen tussen specifieke hersengebieden.

Op dit moment is patiëntenzorg na vroege hersenschade gericht op couveuse-zorg, hulpmiddelen en revalidatie. Deze zorg en de ontwikkeling van nieuwe therapieën is ernstig beperkt omdat de onderliggende pathologieën niet goed begrepen worden. Door inzichten uit dit onderzoeksvoorstel kunnen we in de toekomst een beter verband leggen tussen specifieke pathologie van hersenverbindingen en de klinische uitkomst voor de patiënt. Dit inzicht in het verband tussen een defect in een specifieke hersenverbinding en de klinische uitkomst kan vervolgens ingezet worden om doeltreffendere therapieën te ontwikkelen. Immers, er is uit eerder onderzoek gebleken dat schade aan een bepaald hersengebied secundaire schade kan veroorzaken in een ander hersengebied. De identificatie van deze secundaire hersengebieden en de verbindingen tussen die gebieden kan een belangrijke rol spelen in de bepaling van de beste therapie. Hierdoor kan revalidatie therapie beter toegespitst worden per patiënt waardoor in de toekomst therapie ontwikkeld kan worden gericht op het herstel van specifieke hersenbanen.

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?

Het hoofddoel van het onderzoek is om **een causale en mechanistische verklaring op te stellen voor gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade**. Aan dit hoofddoel wordt invulling gegeven door twee sporen te volgen, ieder ingegeven door de kliniek:

1. simulatie van de aandoening
2. specifieke interventie op één projectie tegelijkertijd

Om deze doelen te halen zoeken we antwoord op de vraag: *Hoe veroorzaken hersenafwijkingen gedragsveranderingen zoals gezien bij patiënten met vroege hersenschade?*

Hiervoor gebruiken we muismodellen voor vroege hersenschade om een vergelijking te maken tussen normaal ontwikkelende muizen (zonder hersenschade), en muizen uit een hersenschade model wat de situatie in de patiënt (met vroeggeboorte of zuurstofgebrek hersenschade) goed simuleert. Hiermee maken we een directe link met de kliniek.

Maar, ons doel is ook om een causaal en mechanistische verklaring op te stellen voor die gedragsveranderingen. Als we direct bewijs hebben uit de kliniek of uit onze muismodellen dat een specifieke verbinding is aangedaan bij vroege hersenschade gaan we direct onderzoeken wat het effect van veranderde activiteit in deze hersenverbinding is op gedrag, elektrofysiologie en expressie van genen in neuronen betrokken bij deze hersenverbinding. Door specifieke hersenverbindingen te manipuleren kunnen we causaliteit vaststellen tussen veranderingen in die specifieke hersenverbinding en de gedragsveranderingen.

3.3 Belang

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

De incidentie van geboorte-asfyxie/zuurstofgebrek bij de geboorte (ook wel hypoxisch-ischemisch (HI) insult is relatief hoog. Per jaar ondervinden wereldwijd ongeveer 1.15 miljoen baby's een HI insult. In Nederland zijn dat 2-6 per 1000 levend geboren kinderen. Ongeveer 15 tot 20% van deze kinderen sterft aan de gevolgen van het HI insult, en tussen de 20 en 40% ondervindt blijvende neurologische schade. Dit is een enorm probleem met een geschat aantal disability-adjusted life years (DALYs) van ongeveer 7,000 per 100,000 mensen (Krishnamurthi et al., 2015). Dit betekent dat er per 100,000 mensen per jaar 7,000 jaar verloren gaat aan levenskwaliteit.

Deze verminderde levenskwaliteit uit zich ten eerste in overlijden van patiënten, en ten tweede in verminderde kwaliteit van leven van overlevende kinderen. Deze verminderde kwaliteit uit zich ten eerste in motor problemen waarbij bewegen moeilijk tot zeer moeilijk gaat (bijvoorbeeld spasticiteit aan één of meer ledematen), en patiënten levenslange zorg nodig hebben (Dinomais et al., 2015; Grunt et al., 2015). Ten tweede is er steeds meer bekend over cognitieve afwijkingen bij deze patiënten. Patiënten houden vaak levenslang last van cognitieve beperkingen, of bereiken niet een gemiddeld niveau wat gezien wordt in de algemene populatie (Grunt et al., 2015; Moreira et al., 2014; Wagenaar et al., 2018).

(Extreem) te vroeggeboren kinderen hebben grotere kans op (witte stof) hersenschade dan aterm geboren kinderen. In Nederland wordt ca 10% van alle baby's te vroeg geboren. Helaas neemt het percentage te vroeg geboren kinderen al jaren toe door (1) een stijging van de gemiddelde leeftijd van de moeder, (2) een verhoogd aandeel meerlingzwangerschappen door kunstmatige bevruchting, en (3) een toename van vervroegd opgewekte zwangerschappen ter bescherming van moeder en kind. De consequenties van vroeggeboorte zijn ernstig: meer dan 30-50% van de kinderen groeit op met neurologische problemen, zoals problemen met cognitie, motoriek en sensorische systemen, alsmede verhoogde risico's op het ontwikkelen van psychiatrische aandoeningen zoals ADHD, schizofrenie en autisme.

Het werk wat wij doen binnen dit project: **een mechanistische verklaring vinden** voor de afwijkingen die vaak gezien worden bij patiënten met vroege hersenschade **helpt ons om betere therapieën en interventies te ontwikkelen voor deze patiënten**. Deze therapieën en interventies kunnen vervolgens ingezet worden om de levenskwaliteit van overlevende patiënten te verbeteren.

Een ander groot belang is het wetenschappelijk belang. Er is klassiek vooral aandacht voor de grote hersenen, die worden gezien als de aansturing van vrijwel alle gedragingen. Maar, recent onderzoek laat zien dat ook de kleine hersenen betrokken zijn bij vele processen, en niet alleen beweging (Stoodley et al., 2017). In dit verband zijn ook juist de verbindingen tussen de verschillende hersengebieden van belang omdat geen enkel hersengebied op zich werkt, maar juist in verbinding staat met vele andere gebieden. Het hier voorgestelde onderzoek kan ook juist op dit fundamenteel neurowetenschappelijk vlak een belangrijke bijdrage leveren.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Algemene Vraagstelling

Hoe veroorzaken hersenafwijkingen gedragsveranderingen zoals gezien bij patiënten met vroege hersenschade?

Het antwoord op deze vraag komt overeen met ons uiteindelijke doel om een causale en mechanistische verklaring op te stellen voor gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade.

1. Gebruik van muismodellen voor vroege hersenschade

Om onze onderzoeksvraag te beantwoorden maken we eerst een vergelijking tussen normaal ontwikkelende muizen (zonder hersenschade), en muizen uit een hersenschade model wat de situatie in de patiënt (met vroeggeboorte of zuurstofgebrek hersenschade) goed simuleert. Met deze experimenten kunnen we de volgende vragen beantwoorden:

1.1. Wat zijn de veranderingen van en naar het cerebellum zijn op anatomisch niveau in experimentele modellen van hersenschade?

Met deze vraag stellen we vast welke hersenverbindingen aangedaan zijn en selecteren we die verbindingen voor verder onderzoek.

1.2. Zijn er naast de grove anatomische afwijkingen nog kleinere anatomische afwijkingen vast te stellen, bijvoorbeeld in geassocieerde verbindingen?

Met deze vraag stellen we vast of in andere, geassocieerde verbindingen er anatomische afwijkingen worden gevonden.

1.3. Is het gedrag aangedaan in muis modellen voor vroege hersenschade?

Met deze vraag kijken we specifiek naar het gedrag van de dieren en vergelijken we normaal-ontwikkelende muizen met muizen met hersenschade. Ook maken we direct de expliciete vergelijking met de patiënten.

1.3.1. Is het gedrag op een vergelijkbare manier aangedaan als in patiënten?

1.4. Verandert de genexpressie in neuronen betrokken bij verbindingen aangedaan door vroege hersenschade?

Genexpressie kan veranderen onder invloed van schade. Dit kunnen compenserende effecten zijn, maar ook pathologische. Met deze vraag krijgen we daar inzicht in.

1.5. Zijn er elektrofysiologische veranderingen op synaps niveau en op neuron niveau?

Een verandering in de activiteit van hersencellen wordt verwacht, maar ook veranderingen in de effectiviteit van synapsen. Dit kunnen bijvoorbeeld compensatoire mechanismen zijn waarbij andere verbindingen de functie van verloren verbindingen (gedeeltelijk) overnemen. Met deze vraag en deelvragen krijgen we inzicht in deze mogelijke compensaties.

1.5.1. Zijn er veranderingen in basale synaptische transmissie (in vitro)?

1.5.2. Zijn er veranderingen in synaptische plasticiteit (in vitro)?

1.5.3. Zijn er veranderingen in neurofysiologische eigenschappen van neuronen (in vitro)?

1.5.4. Zijn er veranderingen in het vuurgedrag van neuronen in verbindingen tijdens gedrag (in vivo)?

1.5.5. Zijn er veranderingen in de samenhang van neuronale activiteit tussen gebieden tijdens gedrag (in vivo)?

2. Manipulatie van hersenverbindingen van en naar het cerebellum voor het vaststellen van

causale relaties

Als we direct bewijs hebben uit de kliniek of uit onze muismodellen dat een specifieke verbinding is aangedaan bij vroege hersenschade gaan we direct onderzoeken wat het effect van veranderde activiteit in deze hersenverbinding is op gedrag, elektrofysiologie en expressie van genen in neuronen betrokken bij deze hersenverbinding.

Met de volgende deelvragen is uiteindelijk van iedere onderzochte hersenverbinding vast te stellen wat deze bijdraagt aan het gedrag zoals geobserveerd in patiënten met vroege hersenschade. Bovendien kunnen we door onze genexpressie en elektrofysiologische experimenten een causaal verband vaststellen tussen aandoeningen in hersenverbindingen en gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade.

2.1. Hoe verandert de hersenverbinding op anatomisch vlak als de activiteit in de hersenverbinding wordt gemoduleerd, of als de synaptische overdracht in de hersenverbinding wordt verstoord, of als (een deel van) de axonen in dezelfde of andere hersenverbinding wordt verwijderd?

Omdat verwacht wordt dat sommige interventies, zoals de modulatie van activiteit in een hersenverbinding, geen meetbaar effect opleveren in de *anatomie* van de hersenverbinding, zullen we in de verbinding ook direct in parallel bepalen (geen go/no go) of de genoemde manipulaties veranderingen teweegbrengen in de elektrofysiologie of gen expressie in de neuronen betrokken bij de verbinding, of dat er een verandering in gedrag optreedt.

2.2. Is het gedrag aangedaan bij muizen waarin de hersenverbinding wordt gemanipuleerd?

We verwachten dat zelfs wanneer er geen anatomische veranderingen zijn in hersenverbindingen door manipulatie van die specifieke verbinding, er toch een verandering in gedrag kan optreden. Daarom meten we gedragsveranderingen na de manipulatie van een hersenverbinding van of naar het cerebellum en meten we gedragsveranderingen.

2.2.1. Is het gedrag op een vergelijkbare manier aangedaan als in patiënten?

2.3. Verandert de genexpressie in neuronen betrokken bij gemanipuleerde hersenverbindingen?

Genexpressie kan veranderen onder invloed van activiteit. Daarom willen we onderzoeken of met onze manipulaties van specifieke hersenverbindingen ook veranderingen optreden in genexpressie, en we willen kijken of die veranderingen overeenkomen met wat we zien in de schademodelen.

2.4. Zijn er elektrofysiologische veranderingen op synaps niveau en op neuron niveau tijdens manipulatie van hersenverbindingen?

Elektrofysiologische veranderingen zijn, net als bij de schademodelen, te verwachten wanneer de activiteit in specifieke verbindingen wordt veranderd. Compensatie door niet-gemoduleerde verbindingen kan optreden, net als bij de schademodelen. Dit willen we via deze vragen in kaart brengen.

2.4.1. Zijn er veranderingen in basale synaptische transmissie (in vitro)?

2.4.2. Zijn er veranderingen in synaptische plasticiteit (in vitro)?

2.4.3. Zijn er veranderingen in neurofysiologische eigenschappen van neuronen (in vitro)?

2.4.4. Zijn er veranderingen in het vuurgedrag van neuronen in verbindingen tijdens gedrag (in vivo)?

2.4.5. Zijn er veranderingen in de samenhang van neuronale activiteit tussen gebieden tijdens gedrag (in vivo)?

Haalbaarheid

De deelprojecten worden uitgevoerd door verschillende AIO's, biotechnici, post-doctoraal onderzoekers en de PIs binnen de onderzoeksgroep. Dit geeft de gelegenheid om de deelprojecten in parallel uit te voeren. Hierdoor zullen deelprojecten in tijd overlappen en is er veel samenwerking tussen de betrokken onderzoekers, dit komt de doorlooptijd ten goede.

Ons laboratorium en de verantwoordelijke onderzoekers hebben gezamenlijk vele tientallen jaren ervaring met elektrofysiologisch, genetisch, optogenetisch, chemogenetisch en gedragsonderzoek. Ook is er binnen de afdeling waarin dit onderzoek ingebed wordt jarenlange ervaring met het gebruik van de hier gebruikte hersenschademodelen (zie ook CCD AVD115002016751). Zo is er bijvoorbeeld recentelijk

een klinische trial opgestart met als doel het testen van stamceltherapie om hersenschade te herstellen. Deze therapie is eerst getest in de schademodelen die hier genoemd zijn.

Ook de klinische implicaties van dit onderzoek kunnen snel geïmplementeerd en op waarde geschat worden door de nauwe samenwerking van onze onderzoeksgroep met de afdeling neonatologie van het UMC Utrecht/WKZ. Deze samenwerking is cruciaal voor een goede implementatie van en vergelijking met de neonatale schade modellen. De samenwerking tussen de klinische afdeling Neonatologie en de preklinische afdeling Developmental Origins of Disease (DDOD, voormalig NIDOD) is al jarenlang heel nauw, waardoor translatie van experimentele uitkomsten en nieuwe therapieën voor patiënten enerzijds, en nieuwe klinische inzichten vertalen in goede diersmodellen anderzijds, uiterst soepel verloopt en betekenisvolle resultaten voor de patiënten oplevert. Een voorbeeld hiervan is de eerder genoemde trial met stamceltherapie.

Algemene strategie

Zoals hierboven beschreven hebben we als hoofddoel om **een causale en mechanistische verklaring op te stellen voor gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade**.

Aan dit hoofddoel wordt invulling gegeven door twee sporen te volgen, ieder ingegeven door de kliniek:

1. simulatie van de aandoening
2. specifieke interventie op één projectie tegelijkertijd

Zoals weergegeven onder onderdeel 3.2 binnen de algemene doelstelling, zijn beide aanpakken nodig om tot een causale en mechanistische verklaring te komen die goed aansluit bij de klinische observaties. De stromen binnen deze verschillende onderzoeken zijn weergegeven in Figuur 4.

Stap 1: Gebruik van muismodellen voor vroege hersenschade

Met de informatie uit de kliniek zijn muismodellen opgezet die vroege hersenschade kunnen nabootsen bij ofwel voldragen baby's met zuurstofgebrek hersenschade ofwel bij te vroeg geboren baby's met witte stof hersenschade, en zo een manier verschaffen om in detail deze vormen van vroege hersenschade te kunnen onderzoeken (Shen et al., 2012). Als model voor vroege hersenschade bij voldragen kinderen met zuurstofgebrek, gebruiken we het RV model (Rice et al., 1981), waarbij bij muizenpups op p9 een carotis occlusie wordt uitgevoerd, gevolgd door systemische hypoxie gedurende maximaal een uur. Deze combinatie zorgt voor focale hersenschade vergelijkbaar met wat gezien wordt in neonatale patiënten met een asfyxie of een arterieel ischemisch infarct. Voor de simulatie van diffuse premature witte stof hersenschade gebruiken we een model waarbij er op p5 een carotis occlusie uitgevoerd wordt, gevolgd door systemische hypoxie en een injectie met lipopolysacchariden (LPS) afkomstig van E.Coli (Shen et al., 2012). Deze combinatie van interventies op dit moment in de ontwikkeling zorgt voor een activatie van het immuunsysteem en veroorzaakt diffuse hersenschade vergelijkbaar met diffuse schade geobserveerd premature patiënten.

<i>Muizenlijn</i>	<i>Expressie lokalisatie</i>
Ntsr1	Cerebellaire kernen
En2	Cerebellaire kernen
Rbp4	Laag 5 pyramidaal cellen
Pcp2	Purkinje cellen
GAD2	GABAerge neuronen
vGluT1	Pontine kernen
Hb9	Motor neuronen
LSL-FlpO	Omzetten van voorbijgaande expressie naar blijvende expressie

Tabel 2: Voorbeelden van muizenlijnen voor recombinases.

De hier vermelde muizenlijnen zijn voorbeeldlijnen die we kunnen gebruiken om specifieke populaties neuronen te targeten. Deze, en andere lijnen, en combinaties van muizenlijnen zullen worden beoordeeld op geschiktheid voordat er gebruik van zal worden gemaakt (Zie bijlage 3). Deze dieren zullen zowel bij de schademodelen (bijlage 1) als bij de experimentele manipulaties (zie bijlage 2) worden ingezet om specifieke populaties te targeten. Bij de schademodelen kan dit nodig zijn om de anatomie, elektrofysiologie of genexpressie van specifieke banen te karakteriseren.

Stap 1.1: Wat zijn de veranderingen op anatomisch niveau in modellen van vroege hersenschade?

Met de twee genoemde schademodelen zijn we in staat te onderzoeken wat de anatomische veranderingen zijn in de hersenverbindingen van en naar het cerebellum in deze dieren. Met deze gedetailleerde onderzoeken kan er vervolgens doelgericht gezocht worden naar dezelfde defecten in patiënten waar deze defecten kunnen worden vastgesteld met behulp van MRI technieken.

Anatomisch onderzoek zal worden gedaan met standaard tracers en virus tracers (Voor voorbeelden zie Tabel 3). Tracers kunnen worden geïnjecteerd in een doelgebied of in een afferent gebied (retrograde, dwz geïnjecteerd rond de uitloper en terug getransporteerd naar het cellichaam; of anterograde tracing, dwz geïnjecteerd bij het soma en getransporteerd naar de uitlopers.). Combinaties van tracers (Tabel 3) en muizenlijnen (Voor voorbeelden, zie Tabel 2) kunnen worden gemaakt om specifieke afferente en efferente banen te onderzoeken. In sommige gevallen, zoals voor rabiës tracing, worden er altijd twee injecties gemaakt met verschillende tracers in verschillende gebieden. Via deze methoden karakteriseren we de schade en veranderingen in het brein in de schademodelen en vergelijken die met de normale situatie.

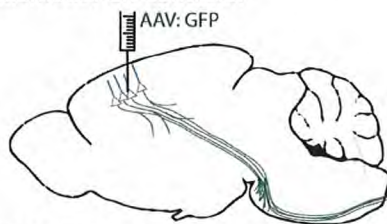
Naam	Doel
<i>Conventionele tracers</i>	
Retrobeads	Injectie in een doelgebied zorgt voor retrograad transport door axonen naar somata van neuronen die axonen projecteren naar het geïnjecteerde doelgebied.
Cholera toxin subunit B (CTB)	Injectie van CTB geeft geen klinische verschijnselen van cholera, en is inert. Het wordt van projectiegebied retrograad getransporteerd via axonen naar de somata van neuronen die projecteren naar het injectiegebied.
<i>Virus tracers</i>	<i>AAV: adeno-associated virus. Verschillende serotypen kunnen worden gebruikt voor anterograde tracing (serotypen 1, 2, 5, 8 & 9) of retrograde tracing (serotype 2r).</i>
AAV: Expressie van recombinases	Injectie van AAV vectoren om de expressie van bepaalde recombinase eiwitten te sturen. Recombinase eiwitten maken conditionele expressie van andere eiwitten mogelijk en stellen ons in staat zeer precieze tracing experimenten uit te voeren.
AAV: Expressie fluorescente eiwitten – cel vullend	Injectie van AAV vectoren om de expressie van fluorescente eiwitten te sturen. Genen die tot expressie gebracht worden via deze virussen coderen voor fluorescente eiwitten zoals GFP, YFP, RFP (algemeen XFP), mRuby, tdTomato, of Brainbow constructen.
AAV: Expressie TVA receptor en G-eiwit voor rabiës tracing	Injectie van AAV om de expressie van de TVA (avian sarcoma leukosis virus) receptor te sturen. Deze receptor is nodig voor infectie van zoogdiercellen met gepseudotypeerd rabiës virus met envelop A. Vaak wordt expressie van deze receptor gecombineerd met een gen voor de expressie van het G capsid eiwit van het rabiës virus. Samen zorgen deze eiwitten er voor dat envelop A pseudotype rabiës een specifieke groep geselecteerde zoogdierneuronen kan infecteren waarna alleen vanuit deze cellen het virus nog 1 synaps kan oversteken naar andere niet geselecteerde neuronen.
Rabiës virus: Transsynaptische tracing	Tracing met rabiës virus heeft als voordeel over AAV dat er tracing gedaan kan worden over een synaps, daarom de aanduiding 'transsynaptisch'. Met het rabiës virus kunnen genen worden geïntroduceerd voor fluorescente eiwitten om hersenverbindingen te traceren (zie boven). Rabiës virus tracing is afhankelijk van een eerdere injectie met AAV (zie cel hierboven in deze tabel).

Tabel 3: Voorbeelden van gereedschappen voor tracing.

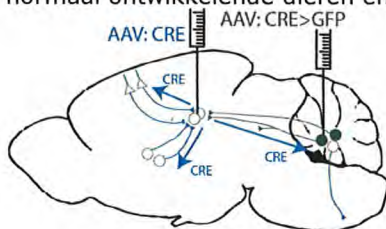
Conventionele tracers (voor voorbeelden, zie bovenste twee) en virus tracers (voor voorbeelden zie onderste vier) worden beide gebruikt om een gedetailleerd overzicht te verkrijgen van eventuele anatomische defecten aan hersenverbindingen in muismodellen van vroege hersenschade. Deze en andere gereedschappen zullen worden gebruikt voor tracing.

Voorbeeldexperimenten ter illustratie van de aanpak:

Voorbeeld 1. Voor de bepaling of motor cortex een verbinding maakt met de pons wordt een AAV, coderend voor GFP geïnjecteerd in de motor cortex van normaal ontwikkelende muizen en muizen met vroege hersenschade. Na enkele dagen tot weken worden de hersenen van de muizen onderzocht en worden door GFP gevisualiseerde hersenverbindingen geanalyseerd en vergeleken tussen muismodel en controle.



Voorbeeld 2. Voor de bepaling of axonen die projecteren vanaf het cerebellum naar de thalamus ook verbindingen maken in andere delen van de hersenen wordt een combinatie van tracers gebruikt. Allereerst wordt er in de thalamus een AAV geïnjecteerd waarmee de recombinase cre tot expressie gebracht wordt in alle neuronen die naar de thalamus projecteren. Met een tweede injectie met AAV in het cerebellum kunnen we er voor zorgen dat alleen de neuronen in het cerebellum die projecteren naar de thalamus worden gekleurd. Vervolgens kunnen verbindingen vanaf het cerebellum naar de thalamus, en alle collateralen van die verbinding worden vergeleken tussen normaal ontwikkelende dieren en dieren met vroege hersenschade.



Alleen als er een verschil gevonden wordt in een bepaalde hersenverbinding tussen normaal ontwikkelende dieren en dieren met vroege hersenschade, dan wordt die verbinding verder onderzocht in de volgende stappen (Go/no-Go moment, Figuur 4).

Stap 1.2 – Stap 1.4: Hoe veranderen gedrag (1.2), genexpressie (1.3) & elektrofysiologie (1.4) in modellen van vroege hersenschade?

Als we hebben vastgesteld dat er een verandering is in de aan of afvoerende cerebellaire verbindingen in onze modellen voor vroege hersenschade, gaan we verder met de analyse van gedrag, genexpressie en elektrofysiologie van die hersenverbindingen die veranderd zijn gebleken. De analyse van gedrag, genexpressie en elektrofysiologie vindt dan weer plaats in het diermodel waarin de verbinding aangedaan is bevonden.

Gedragsexperimenten zullen worden uitgevoerd met muizen met vroege hersenschade en met gezond ontwikkelende controle dieren (nestgenootjes). Met verschillende gedragstesten zullen we eventuele gedragsveranderingen bij de muizen met vroege hersenschade in kaart brengen. Allereerst zullen de dieren worden geobserveerd in de thuishoek met Neuro-E-Mit (de Chaumont et al., 2019) of met deepplabcut (Mathis et al., 2018; Nath et al., 2019; Wei et al., 2018). Daarnaast zullen we dieren observeren in een open field met deepplabcut. Hieruit verkrijgen we gedetailleerde data voor kinematische analyse van bewegingen. Daarnaast zullen we rotarod tests (Tsai et al., 2012), Erasmus ladder tests (Sathyanesan et al., 2018), en een gecontroleerde voorpootbeweging (Galiñanes et al., 2018) gebruiken voor verdere analyse van motor performance en motor leren. Sociaal gedrag zal worden geanalyseerd

met de three-chamber test for social approach and novelty (Tsai et al., 2012; Yang et al., 2011), waarbij een muis de keuze heeft uit verschillende kamers met een nieuwe, onbekende muis, of een nieuw object. Flexibel gedrag testen we met een Y-maze, en ten slotte testen we angst of exploratief gedrag met een elevated plus maze (Walf et al., 2007). Deze combinatie van gedragstesten wordt vaker gebruikt in het hersenonderzoek, en is ook al eerder toegepast bij muizen met een autistisch fenotype veroorzaakt door defecten in het cerebellum (Tsai et al., 2012; Stoodley et al., 2017).

Genexpressie zal worden geanalyseerd met gangbare technieken. Muizen met vroege hersenschade worden vergeleken met controle dieren. In dunne hersenplakjes wordt de expressie van genen gevisualiseerd met RNAscope (F. Wang et al., 2012) of vergelijkbare in-situ hybridizatie technieken of met RNA sequencing (Ozsolak et al., 2011). Aan de hand van deze experimenten is vast te stellen of er op transcriptie-niveau veranderingen optreden in het brein van muizen met vroege hersenschade. Genen die hier gevonden worden kunnen terug gerelateerd worden aan genen in patiënten en zo genetisch onderzoek, of doelgerichte zoektochten naar therapieën informeren.

Elektrofysiologie wordt zowel in vitro als in vivo uitgevoerd. Voor in vitro patch-clamp experimenten zullen eerst in verschillende neuronen (varianten van) channelrhodopsin tot expressie worden gebracht (Tabel 4). Door na enkele dagen tot weken acute slices te maken van hersenweefsel van deze dieren kunnen axonen die channelrhodopsin tot expressie brengen worden gestimuleerd, en het resultaat daarvan kan gemeten worden in postsynaptische cellen (Jackman et al., 2014). Hiermee kunnen we de synaps in groot detail bestuderen (Jackman et al., 2014, 2016; Turecek et al., 2017).

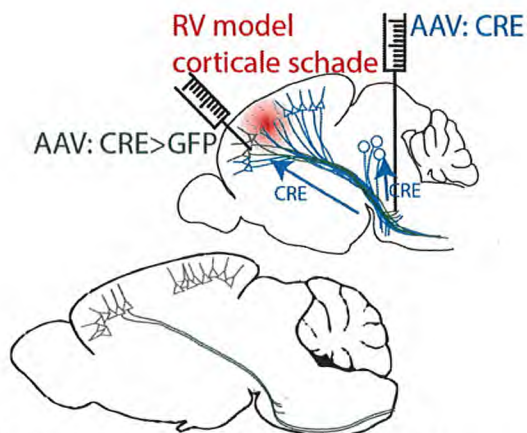
In vivo elektrofysiologie zal worden uitgevoerd door in de verschillende inputs naar en outputs van het cerebellum (Tabel 1), of in het cerebellum zelf metingen uit te voeren (Jackman et al., 2014; Turecek et al., 2019; Witter et al., 2013):

- Single-unit recordings (waarbij de activiteit van een enkel neuron is te onderscheiden, Hoebeek et al., 2010),
- Multi unit metingen (waarbij de activiteit van enkele neuronen tegelijkertijd wordt opgenomen zonder dat er onderscheid gemaakt kan worden tussen verschillende neuronen),
- veldpotentiaal recordings (waarbij een zeer lokaal EEG signaal in de hersenen wordt gemeten), of
- EEG recordings zullen worden gemaakt van deze gebieden (Buzsáki, 2004; Buzsáki et al., 2012).

Deze metingen zullen gecombineerd worden en op verschillende plaatsen in het brein zullen tegelijkertijd metingen worden verricht om de samenhang tussen de signalen te kunnen analyseren (Kros et al., 2015). Voor sommige metingen kan het noodzakelijk zijn om een verbinding met channelrhodopsin te manipuleren zodat er onderscheid gemaakt kan worden tussen verschillende neuronen (zgn. Optotagging: Roux et al., 2014).

Voorbeeldexperimenten ter illustratie van de aanpak:

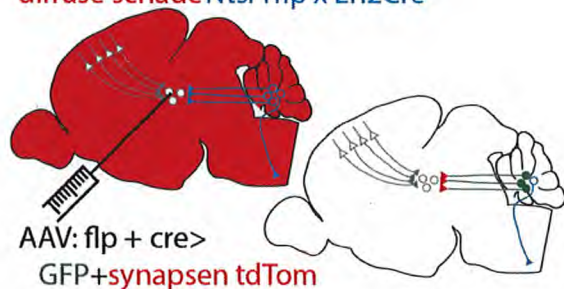
3. Om te bepalen of focale hersenschade op de motor cortex veranderingen in gedrag en connectiviteit in de cortico-pontine verbinding veroorzaakt, gebruiken we het RV model om focale schade te veroorzaken op de motor cortex in een groep muizen. Ook maken we een controle groep uit hetzelfde nest die een normale ontwikkeling ondergaan. Op jonge leeftijd worden alle muizen geïnjecteerd in de pons met een AAV die cre tot expressie brengt in alle aanvoerende banen. Vervolgens kleuren we een deel van die banen door in de motor cortex met een AAV GFP tot expressie te brengen. Dit zorgt er voor dat alleen cortico-pontine verbindingen aangekleurd worden. Vervolgens zullen alle dieren de gedragstesten ondergaan zoals beschreven. Na de gedragstesten worden de dieren geperfuseerd en worden hun hersenen uitgenomen en onderzocht om de cortico-pontine verbinding te analyseren. Dit zal dan vergeleken en gecorreleerd worden met de resultaten



van de gedragstesten.

4. Om te bepalen of premature diffuse witte stof hersenschade veranderingen in de anatomie van de cerebello-thalamische verbinding veroorzaakt gebruiken we het DHS model voor diffuse schade. Dit voeren we uit op een kruising van de Ntsr1flp en En2cre muizenlijnen zodat alleen in de cerebellaire kerncellen zowel flp als cre tot expressie komt. Met grote injecties met AAV in de thalamus zorgen we voor de expressie van GFP en synaptophysin-tdTomato in alleen de verbinding van de cerebellaire kernen naar de thalamus. In deze verbinding zullen de neuronen groen gekleurd worden, en de synapsen rood. Met deze combinatie kunnen we anatomische veranderingen analyseren in zowel de axonen (groen) als in de synapsen die deze axonen maken (rood).

DHS model Muis:
diffuse schade Ntsr1flp x En2Cre



Doel/ Gebruik - Virussen	Virus	Voorbeelden van constructen
Expressie Channelrhodopsin en varianten	AAV	ChR2(H143R), ReaChR, ChRimson, ChRonos, C1V1, ChIEF, ChETA, eNpHR, Arch, iChloC, ACR, swiChR
Expressie calcium indicatoren	AAV	GCaMP3.0 - 7.0
Expressie voltage indicatoren	AAV	Arch, ArcLight ASAP, Ace2N
Expressie chemogenetics receptoren	AAV	hM3Dq, hM4Di, KORD
Modulatoren van synaptische transmissie	AAV	iCali, miniSOG generatoren

Doel/ Gebruik - muizenlijnen	Voorbeelden van muizenlijnen
Expressie van de chemogenetics receptoren, samen met een fluorophore, onder controle van recombinases	Flox-hM4Di-Citrine, flox-rtt-hM4Di-Double, flox-hM3Dq-Citrine
Expressie van (varianten van) ChR2 onder controle van recombinases of direct onder controle van promotoren	Ai32, Thy1-ChR2-YFP, Ai27, Ai14

Tabel 4: Voorbeelden van virusconstructen en muizenlijnen die ingezet kunnen worden

voor in vitro & in vivo elektrofysiologische, en chemogenetische metingen en manipulaties

Adeno-associated virussen en muizenlijnen kunnen worden gebruikt om verschillende tools tot expressie te brengen voor elektrofysiologisch onderzoek. Het bovenste deel van de tabel geeft voorbeelden van de soort gereedschappen die we tot expressie kunnen brengen met virussen, het onderste deel geeft een soortgelijk overzicht voor muizenlijnen. De geschiktheid van deze muizenlijnen kan, indien nodig, getest worden binnen bijlage 3.

Stap 2: Manipulatie van hersenverbindingen voor het vaststellen van causale relaties

We kunnen op vijf manieren de activiteit, verbinding of synaptic release van hersenverbindingen verstoren. Ten eerste kunnen we chemogenetics gebruiken om activiteit in hersenverbindingen te remmen of te stimuleren. Ten tweede kunnen we optogenetics gebruiken om op kortere tijdschalen de hersenverbindingen te manipuleren. Ten derde kunnen we hersenverbindingen ableren doormiddel van knockout technieken voor signaal moleculen. Ten vierde kunnen we knockouts voor synaptische eiwitten gebruiken om synaptische release in specifieke verbindingen volledig stil te leggen al vanaf het eerste deel van de ontwikkeling. En ten slotte kunnen we de productie van zuurstofradicalen aanwenden om synaptische eiwitten voor kortere tijd te ableren (Tabel 5, onderste deel). Wij verwachten dat van deze vijf mogelijkheden er drie nodig hebben per verbinding om de rol van die verbinding te ontrafelen.

<i>Experimentele manipulaties</i>	<i>Stap</i>	<i>Voorbeelden</i>
1. Remming of stimulatie hersenverbindingen met chemogenetics	2	hM4Di, hM3Dq, KORD
2. Remming of stimulatie van hersenverbindingen met optogenetics	2	ChR2, ReachR, Chronos
3. Ablatie van axonen binnen een hersenverbinding	2	Math1 KO
4. Volledige blokkade van synaptische release binnen een hersenverbinding	2	Munc18-1 KO
5. Transiënte blokkade van synaptische release binnen een hersenverbinding	2	miniSOG, iCali

Tabel 5: Overzicht van experimentele manipulaties van verbindingen.

Vijf experimentele manipulaties worden gebruikt om een causaal verband aan te tonen tussen veranderingen in specifieke hersenbanen en de symptomen gezien in de schademodelen (onderste deel). In de rechter kolom staan enkele voorbeelden van gereedschappen die hiervoor gebruikt kunnen worden, zie ook Tabel 4.

Stap 2.1 – stap 2.4: Hoe veranderen de anatomie van hersenverbindingen (2.1), gedrag (2.2), genexpressie (2.3) & elektrofysiologie (2.4) na het manipuleren van hersenverbindingen?

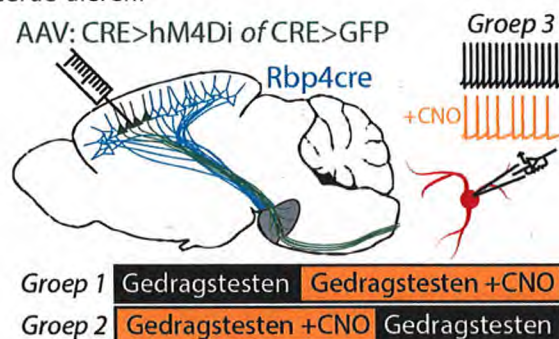
Om een goed beeld te krijgen van hoe verschillende manipulaties een impact hebben op de anatomie van hersenverbindingen, gebruiken we dezelfde experimenten als beschreven onder stap 1.1 en 1.2 (zie ook Tabel 3). Omdat we kleine veranderingen verwachten als gevolg van onze manipulaties, zullen we ook direct beginnen met vaststellen of er veranderingen zijn in elektrofysiologie, gedrag en genexpressie.

Ook zullen er controle experimenten nodig zijn om te controleren of de manipulaties werken zoals wij bedoeld hadden. Dus van een aantal dieren die eerst in vivo elektrofysiologische metingen of gedragsproeven ondergaan, zal in een tweede deel van het onderzoek in vitro het effect van manipulaties worden vastgesteld op het niveau van verbindingen en enkele cellen door gebruik te maken van patch-clamp metingen. Bijvoorbeeld voor muizen waarin een projectie is geïdentificeerd door middel van optotagging zal vervolgens worden vastgesteld in vitro in welke neuronen inderdaad channelrhodopsin tot expressie komt in de celpopulatie. Ook zal bijvoorbeeld van de chemogenetics worden vastgesteld of de kunstmatige liganden van de designer receptoren inderdaad het cellulaire effect bewerkstelligen zoals bedoeld.

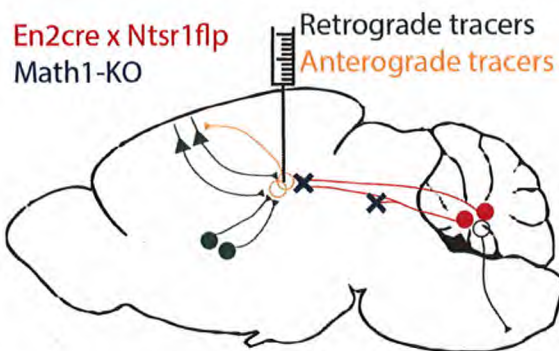
Voorbeeldexperimenten ter illustratie van de aanpak:

5. Om te bepalen of acuut verminderde activiteit van het cortico-pontine tract gedragsveranderingen veroorzaakt wordt de chemogenetische modulator hM4Di tot expressie gebracht in laag 5 pyramidaal cellen van de motor cortex. Hiervoor gebruiken we de Rbp4cre lijn, gecombineerd met een injectie met AAV floxed-hM4Di dread in de motor cortex. De dieren

ondergaan de gedragstesten tweemaal: eenmaal zonder de chemogenetische modulator CNO en eenmaal met de chemogenetische modulator. Als controle worden er ook dieren getest die via AAV floxed-GFP alleen het fluorescente eiwit GFP tot expressie hebben gekregen. Verder worden de groepen gesplitst waarbij de ene groep eerst zonder en daarna met CNO getest wordt, en de andere groep eerst met en daarna zonder (cross-over design). Vervolgens wordt de helft van de met floxed-hM4Di geïnjecteerde dieren samen met de helft van de met floxed-GFP geïnjecteerde geanalyseerd voor anatomische doeleinden. De andere helft van de dieren zal worden gebruikt voor in vitro patch clamp experimenten waarbij er bepaald wordt of CNO inderdaad inhibitie van alleen laag 5 pyramidaal cellen bewerkstelligt, en niet van andere cellen, en alleen in de met floxed-hM4Di geïnjecteerde dieren.

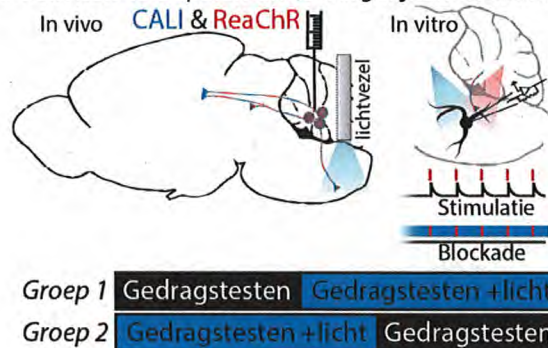


6. Om te bepalen of het gedrag van dieren en de connectiviteit van hersenverbindingen verandert als cerebello-thalamische banen volledig worden geablateerd gebruiken we de *Ntsr1flp*, *En2cre* en *Math1-KO* muizenlijnen. De kruising van deze drie lijnen veroorzaakt een ablatie van alle axonen van de cerebellaire kernen naar de thalamus in homozygote *Math1-KO* muizen (Tabel 5). In alle dieren van een nest plaatsen we retrograde en anterograde injecties in de thalamus met conventionele tracers. De dieren worden allemaal gedragsmatig getest en vervolgens geperfuseerd waarna de hersenen worden uitgenomen voor analyse. De aan- of afwezigheid van de cerebello-thalamische banen zal worden gecorreleerd aan anatomische veranderingen van en naar de thalamus (detecteren van eventuele compensatoire mechanismen), en worden gecorreleerd aan de uitkomsten van de gedragsmaten. Omdat zowel homozygote knockouts, heterozygoten en normaal ontwikkelende dieren worden geboren uit onze kruisingen is er een interne controle binnen ieder nest.



7. Om veranderingen in de genexpressie en in-vivo activiteit na blokkade van synaptische release in de verbinding van het cerebellum naar de hersenstam gebruiken we de modulator van synaptische release *iCali*. AAV met *iCali* zal worden geïnjecteerd in de cerebellaire kernen samen met AAV voor expressie van een red-shifted variant van channelrhodopsin, bv *ReaChR* (dit om twee gescheiden kleuren lichtpulsjes te kunnen geven voor verschillende effecten: Blauw >> Activatie *iCali*. Rood >> Activatie channelrhodopsin variant) en een lichtvezel zal worden geplaatst vlak boven de hersenstam. Dieren worden getest op de gedragsmaten. Tegelijkertijd met het gedrag zal de synaptische release worden stilgelegd in de helft van de dieren via een serie van lichtpulsjes door de lichtvezel. De gedragsexperimenten worden na enkele dagen herhaald waarbij control en testgroep

omgedraaid worden (cross-over design). Na de gedragsexperimenten wordt de helft van de dieren gebruikt voor een controle experiment in vitro waarbij afferenten worden gestimuleerd met rood licht voor en na inactivatie van synapsen. Er zal in deze experimenten gekeken worden naar de effectiviteit van inactivatie en de tijdsconstante voor herstel van de inactivatie. De andere helft van de dieren zal worden gebruikt om direct na inactivatie van synaptische overdracht in wederom de helft van deze groep expressie van verschillende genen betrokken bij synaptische overdracht en neuronale activiteit te bepalen en te vergelijken tussen de inactivatie en controle groep.



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

Alle proeven worden uitgevoerd in muizen. Dit zijn zowel wild-type als genetisch gemanipuleerde muizen, al dan niet in combinatie met virus vectoren (Zie ook Tabel 2 voor muizenlijnen voor voorbeelden voor recombinase expressie, Tabel 3 voor voorbeelden van tracing methoden – inclusief virusmethoden, en Tabel 4 voor voorbeelden van experimentele modulatie van neuronen via genetische gereedschappen).

In de onderstaande tabel staat een overzicht van de gebruikte dierproeven en de daarbij behorende technieken.

Uitleesparameter		Deelvragen	Te combineren met:	Techniekentabellen
Anatomische verbinding				
A	Visualisatie axonen	1.1, 1.2 & 2.1	D-J, O, P	Tabel 2, Tabel 3
B	Visualisatie synapsen	1.1, 1.2 & 2.1	D-J, O, P	Tabel 2, Tabel 3
C	Visualisatie netwerken	1.1, 1.2 & 2.1	D-J, O, P	Tabel 2, Tabel 3
Gedrag				
D	Gedragsobservatie in thuishokoi	1.3 & 2.2	A-P	2.2: Tabel 5
E	Rotarod tests	1.3 & 2.2	A-P	2.2: Tabel 5
F	Erasmus ladder tests	1.3 & 2.2	A-P	2.2: Tabel 5
G	Angst gedrag	1.3 & 2.2	A-P	2.2: Tabel 5
H	Sociale interactie	1.3 & 2.2	A-P	2.2: Tabel 5
I	Onderzoeksgedrag	1.3 & 2.2	A-P	2.2: Tabel 5
J	Gecontroleerde voorpootbewegingen	1.3 & 2.2	A-P	2.2: Tabel 5
Elektrofysiologie				
K	In vitro elektrofyfiologie – patch clamp	1.5.1-3 & 2.4.1-3	D-J,Q	Tabel 2, Tabel 4, Tabel 5
L	In vivo elektrofyfiologie – silicon probes	1.5.4-5 & 2.4.4-5	D-J	Tabel 2, Tabel 4, Tabel 5
M	In vivo elektrofyfiologie – field	1.5.4-5 &	D-J	Tabel 2, Tabel 4, Tabel 5

	recordings	2.4.4-5		
N	In vivo elektrofysiologie – EEG	1.5.4-5 & 2.4.4-5	D-J	Tabel 2, Tabel 4, Tabel 5
	Gen expressie			
O	In situ hybridatie (en varianten)	1.4 & 2.3	A-J	Tabel 2, Tabel 4, Tabel 5
P	Single cell expressie profielen	1.4 & 2.3	A-J	Tabel 2, Tabel 4, Tabel 5
Q	Patch-seq	1.4 & 2.3	K	Tabel 2, Tabel 4, Tabel 5

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.

Er is fasering van uitvoering door drie go/no-go momenten. Allereerst is er een go/no-go moment tussen de anatomische onderzoeken onder stap 1 en de elektrofysiologie, gedrag en genexpressie analyse. Als er geen afwijkingen worden gevonden bij de schademodelen in een bepaalde hersenverbinding, dan wordt er verder geen onderzoek gedaan naar die verbinding in stap 2. Zodra er veranderingen zijn waargenomen in anatomische verbindingen onder stap 1, en er zijn veranderingen in gedrag, elektrofysiologie of genexpressie, alleen dan wordt de hersenverbinding verder onderzocht door specifiek die hersenverbinding te manipuleren met de technieken zoals beschreven in het tweede deel van Tabel 5. Dit is het tweede go/no-go moment in de proefopzet. Een alternatief pad naar de experimenten zoals beschreven in het tweede deel van Tabel 5 wordt gevormd door directe indicaties uit de kliniek dat een bepaalde hersenverbinding specifiek is aangedaan bij patiënten met vroege hersenschade. Dit is het derde go/no-go moment in de proefopzet. Onder stap 2 zelf zijn er geen go/no-go momenten omdat de effecten op anatomie waarschijnlijk subtiel kunnen zijn, en een afwijking in één van de parameters van elektrofysiologie, gedrag of genexpressie van klinisch belang kan zijn. Voor een schematisch overzicht van de experimenten, hun samenhang en de verschillende go/no-go momenten, zie ook Figuur 4.

Literatuurlijst voor het gehele projectvoorstel

- Armstrong-Wells, & Ferriero. (2014). *Neurology: Clinical Practice*, 4(5), 378–385.
- Badura ... Wang. (2018). *ELife*, 7(609).
- Boswinkel ... Dudink. (2019).
- Butler, & Hodos. (2005) (Second Edi). Hoboken: Wiley-Interscience.
- Buzsáki. (2004). *Nature Neuroscience*, 7(5), 446–51.
- Buzsáki ... Koch. (2012). *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(6), 407–20.
- de Chaumont ... Olivo-Marin. (2019). *Nature Biomedical Engineering*.
- Dinomais ... Group. (2015). *Human Brain Mapping*, 36(12), 4793–4807.
- Erickson ... Dunlap. (2007). *Neuroscience*, 150(3), 547–55.
- Fletcher ... Jenkins. (1996). *Cell*, 87(4), 607–17.
- Galiñanes ... Huber. (2018). *Cell Reports*, 22(10), 2767–2783.
- Govaert ... Lequin. (2008). *NeuroImage*, 39(4), 1850–1857.
- Grunt ... Steinlin. (2015). *Pediatrics*, 135(5), e1220–e1228.
- Hoebeek ... De Zeeuw. (2010). *PNAS*, 107(8), 8410–15.
- Hortensius ... Dudink. (2018). *Pediatrics*, 142(5).
- Jackman ... Regehr. (2014). *The Journal of Neuroscience*, 34(22), 7704–7714.
- Jackman ... Regehr. (2016). *Nature*, 529(7584), 88–91.
- Krishnamurthi ... Roth. (2015). *Neuroepidemiology*, 45(3), 177–189.
- Kros ... Hoebeek. (2015). *Annals of Neurology*.
- Lequin ... Obenaus. (2009). *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 14(5), 299–310.
- Mathis ... Bethge. (2018). *Nature Neuroscience*, 21(9), 1281–1289.
- Moreira ... Alves. (2014). *Jornal de Pediatria*, 90(2), 119–134.
- Musall ... Churchland. (2019). *Nature Neuroscience*, 22(10), 1677–1686.
- Nath ... Mathis. (2019). *Nature Protocols*, 14(7), 2152–2176.
- Nguyen ... Yager. (2015). In Yager (Ed.) (pp. 1–13). New York, NY: Springer New York.

- Ozsolak, & Milos. (2011). *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 87–98.
- Pieterman ... Counsell. (2017). *Brain Structure and Function*, 222(4), 1625–1634.
- Ribeiro Gomes ... Kennedy. (2019). *Cerebral Cortex*, (July), 1–16.
- Rice ... Brierley. (1981). *Annals of Neurology*, 9(2), 131–141.
- Roux ... Buzsáki. (2014). *Current Opinion in Neurobiology*, 26, 88–95.
- Roze ... Bos. (2009). *Pediatrics*, 123(6), 1493–1500.
- Rumajogee ... Fehlings. (2016). *Frontiers in Neurology* .
- Schonewille ... De Zeeuw. (2011). *Neuron*, 70(1), 43–50.
- Shen ... Deng. (2012). *Journal of Neuroscience Research*, 90(1), 105–121.
- Stanfield ... Fricks. (1982). *Nature*, 298(5872), 371–373.
- Stoodley ... Tsai. (2017). *Nature Neuroscience*, 20(12), 1744–1751.
- Tsai ... Sahin. (2012). *Nature*, 488(7413), 647–51.
- Turecek ... Regehr. (2017). *Nature*, 551, 503.
- Turecek, & Regehr. (2019). *Neuron*, 101(5), 938–949.e4.
- van der Aa ... Zhang. (2013). *Pediatric Research*, 73(6), 756–762.
- van Tilborg ... Nijboer. (2018). *Glia*, 66(1), 78–93.
- van Tilborg ... Nijboer. (2017). *Scientific Reports*, 7(1), 16492.
- Wagenaar ... De Vries. (2018). *Pediatrics*, 142(3).
- Walf, & Frye. (2007). *Nature Protocols*, 2(2), 322–328.
- Wang, F. ... Luo. (2012). *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), 22–29.
- Wang, S. S.-H. ... Badura. (2014). *Neuron*, 83(3), 518–532.
- Wei, & Kording. (2018). *Nature Neuroscience*, 21(September).
- Welniarz ... Roze. (2017). *Developmental Neurobiology*, 77(7), 810–829.
- Witter ... De Zeeuw. (2013). *Frontiers in Neural Circuits*, 7(August), 133.
- Yang ... Crawley. (2011). *Current Protocols in Neuroscience*, 56(1), 8.26.1–8.26.16.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Proeven aan dieren van hersenschademodellen
2	Proeven aan dieren waarin hersenverbindingen worden gemanipuleerd
3	Testen van geschiktheid van, en ongerief in muizenlijnen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD11500202014370
2. Titel van het project : Verbindingen tussen de grote en kleine hersenen en de invloed van vroege hersenschade
3. Titel van de NTS : Verbindingen tussen de grote en kleine hersenen en de invloed van vroege hersenschade

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
 Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
 Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 24-12-2020
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 06-01-2021
 anderszins behandeld: 06-01-2021
 termijnonderbreking(en) van / tot : 11-01-2021 / 13-01-2021 en 20-01-2021 / 10-02-2021
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 17-02-2021

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 06-01-2021
- Plaats: online via Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 4
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:

Een lid legt uit dat de overkoepelende lijn verduidelijkt mag worden. Daarin zou duidelijk moeten worden hoe de uitwerking van de deelhypothesen leidt naar het einddoel. Dus: waar staat onderzoeker nu, wat gaat hij doen en waar wil hij uitkomen? Daarnaast mag duidelijker omschreven worden met welk type experiment, welke vraag beantwoord wordt. Onderzoeker legt uit dat het onderzoek er uiteindelijk toe moet leiden dat er meer bekend wordt over

waar verstoringen in de verbindingen tussen de kleine en grote hersenen toe leiden later in het leven en dat hier weinig over bekend is uit eerder onderzoek. Vervolgens heeft de DEC vragen gesteld over de solitaire huisvesting die in bijlage 2 wordt genoemd. Onderzoeker geeft aan dat (langdurige) solitaire huisvesting niet nodig is bij alle dieren en gaat dit nog anders verwoorden.

Bijlage 3 betreft onderzoek om vast te stellen welke muizenlijnen bruikbaar zijn. Dit zou volgens de DEC al in bijlage 1 besproken moeten worden. Onderzoeker gaat de flow duidelijker beschrijven.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 11-01-2021
- Datum antwoord: 13-01-2021
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U noemt hier een samenwerking met neonatologie. Hoe concreet is die samenwerking? Is dit voor een door de METC goedgekeurd project? Graag uitbreiden voor een sterkere onderbouwing.

Op pagina 4 bovenaan heb ik een extra aantal zinnen toegevoegd die de huidige stand van zaken van onderzoek wat ik bij de neonatologie heb geïnitieerd en aan meewerk. Dit richt zich op MRI-onderzoek, post mortem onderzoek en gedragsonderzoek.

- 3.1 Achtergrond: Op een paar plekken in uw aanvraag geeft u aan dat veranderingen op anatomisch niveau leidend zijn voor uw onderzoek, terwijl u op andere plekken schrijft dat er ook belangrijke functionele veranderingen kunnen optreden zonder dat er anatomische veranderingen waarneembaar zijn. De DEC vraagt zich af hoe groot de prioriteit van de anatomische veranderingen moet zijn, omdat u op deze manier ook zaken zou kunnen missen.

Er is nog zo weinig bekend van hoe veranderingen in deze verbindingen de ontwikkeling kan verstoren dat we eerst de grote veranderingen willen onderzoeken. Ook weten we vanuit de kliniek dat er vaak detecteerbare anatomische veranderingen zijn bij deze groep patiënten. Een eerste schifting in wat we gaan onderzoeken in muizen op basis van anatomie lijkt ons dus niet onredelijk. We sluiten overigens niet uit dat we tijdens dit onderzoek achter specifieke veranderingen komen die we later in meer subtiele schademodelle of veranderingen in de ontwikkeling kunnen detecteren zonder dat daar anatomische schade aan ten grondslag ligt. Maar voor nu willen we ons richten op de grote lijnen, aangezet door anatomische veranderingen om te zorgen dat we in ieder geval een eerste stap kunnen maken.

- 3.1 Achtergrond: De legenda van figuur 2 is niet helemaal duidelijk, de figuur zelf wel. Graag nog even nakijken.

De legenda bevatte nog delen van een oude legenda. Nu aangepast. Dank voor het opmerken.

- 3.2 en 3.4 betreffen respectievelijk het doel en de strategie. Een en ander loopt nu wat door elkaar (zie hierna). Graag een schifting maken tussen strategie en doel.
Ik heb beide zo veel mogelijk proberen te scheiden. Dit heeft er wel toe geleid dat er grote verschuivingen zijn tussen beide onderdelen in de aanvraag. Het een en ander wat is verschoven, maar niet veranderd, is gemarkeerd met blauw.
- Onder 3.2 (Doel en belang) gaat u uitvoerig in op de onderzoeksvragen. De uitwerking van de vragen hoort echter onder 'onderzoekstrategie' (3.4). Graag onder 3.2 kort(er) en concreter het doel van het onderzoek beschrijven.
Aangepast, zie bovenstaande opmerking en aanpassingen in de tekst.
- Onder 3.4 (strategie) begint u met de formulering van het doel van het onderzoek. Hier kunt u de afzonderlijke onderzoeksvragen uitgebreid behandelen. Ook graag aanvullen met welke proef of proeven u welke vraag gaat beantwoorden.
Ook aangepast, zie bovenstaand.
- 3.4.3: Hier staat een foutmelding in plaats van een verwijzing naar een referentie.
Deze kan ik niet terugvinden, alles lijkt nu goed te staan.

Bijlage 1

- Algemeen: De bijlagen mogen nog wat uitgebreider ingeleid worden: waarop is de keuze voor de experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters gebaseerd? Op welke wijzen zullen de resultaten van de voorgenomen experimenten bijdragen aan het behalen van het doel van het onderzoek?
Om herhaling met het projectvoorstel te voorkomen heb ik verwezen naar de relevante passages uit het voorstel.
- B. De dieren: u schrijft onder 'geschatte aantallen': Voor de fijne anatomische experimenten gaan we uit van dezelfde aantallen als voor de fijne anatomische onderzoeken. De DEC vermoedt dat u aan het eind van de zin 'grove' in plaats van 'fijne' bedoelt.
Inderdaad, dank voor het opmerken.
- B. De dieren: De door u berekende uitval klopt niet helemaal. Graag nog een keer naar kijken met de IvD.
Aangepast naar 1675 muizen (afronding naar beneden in plaats van mathematische afronding), dit zorgt voor 335 nesten en 369 zogende moeders.
- C. Hergebruik: U heeft het begrip hergebruik verkeerd geïnterpreteerd. Ook in de andere bijlagen. Er is sprake van hergebruik als dieren meegenomen worden naar een andere aanvraag, wat hier niet het geval is.
Aangepast.
- F. Huisvesting en verzorging: Naar aanleiding van het gesprek met de DEC: graag duidelijker beschrijven welke omstandigheden ertoe kunnen leiden dat dieren solitair gehuisvest moeten worden. Daarbij ook ingaan op ervaringen in het verleden en indien mogelijk een inschatting geven van het percentage dieren waarbij solitaire huisvesting geïndiceerd zal zijn.
Aangepast onder F, maar ook verdere effecten doorgevoerd in tabel K.

- K. Classificatie van ongerief: In de tabel heeft u duidelijk alle varianten van ongerief aangegeven. Alleen de solitaire huisvesting tot 200 dagen mist nog. Graag toevoegen als dit nog van toepassing is.

Ik kan de 200 dagen niet terugvinden, maar ik heb een extra regel met solitaire huisvesting toegevoegd onder de in vivo fysiologie. Hier geldt een maximale tijd van 168 dagen (p21 implantaat, maximale leeftijd p189, dus $189-21 = 168$ dagen).

Bijlage 2

- Algemeen: De bijlagen mogen nog wat uitgebreider ingeleid worden: waarop is de keuze voor de experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters gebaseerd? Op welke wijzen zullen de resultaten van de voorgenomen experimenten bijdragen aan het behalen van het doel van het onderzoek?

Om herhaling met het projectvoorstel te voorkomen heb ik verwezen naar de relevante passages uit het voorstel.

- B. De dieren: Wat is de oorsprong van de muizen die hier gebruikt worden? Zijn de pups afkomstig van dezelfde moeders als in bijlage 1? Waarom rekent u de moeders wel mee in bijlage 1 en niet in bijlage 2? Graag bekijken met de IvD of de muizenmoeders ongerief ondervinden en meegerekend moeten worden. Als dat het geval is, dan graag voor beide bijlagen aanvragen.

In principe zijn dit niet dezelfde moeders als in bijlage 1, maar het kan wel als een moeder uit bijlage 1 weer beschikbaar komt als fokvrouwje en zo weer een 'gewone' fokmuis wordt.

In bijlage 1 worden de moeders blootgesteld aan stress omdat de pups een operatie voor de carotis occlusie moeten ondergaan. In bijlage 2 willen we de mogelijkheid open houden om injecties te doen op z'n vroegst op p0. Hier ondervinden de moeders in feite geen stress van omdat dit een zeer korte ingreep is bij de pups (zie bijvoorbeeld Witter et al. Neuron 2016).

- C. Hergebruik: U heeft het begrip hergebruik verkeerd geïnterpreteerd. Ook in de andere bijlagen. Er is sprake van hergebruik als dieren meegenomen worden naar een andere aanvraag, wat hier niet het geval is.

Aangepast.

Bijlage 3

- Algemeen: De bijlagen mogen nog wat uitgebreider ingeleid worden: waarop is de keuze voor de experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters gebaseerd? Op welke wijzen zullen de resultaten van de voorgenomen experimenten bijdragen aan het behalen van het doel van het onderzoek?

Ik heb een zin toegevoegd aan het eind van het eerste stuk onder A.

- B. De dieren: U schrijft hier dat muizenmoeders geen ongerief zullen ondervinden. De pups worden wel weggehaald op jonge leeftijd. Kunt u dit uitleggen?

Dit zie ik niet terug in de bijlage. Gedragsobservatie zal niet buiten de thuishooi plaatsvinden, maar in combinatie met de moeder. Voor het vaststellen van geschiktheid gebruiken we dieren tussen de 30 en 60 dagen oud, wat ruim na de speenleeftijd is.

- B. De dieren: Ook in deze bijlage aantallen en ongerief van de moedermuizen nakijken met de IvD. Als de moederdieren meetellen, dan ook opnemen in de NTS.

Geen ongerief.

- C. Hergebruik: U heeft het begrip hergebruik verkeerd geïnterpreteerd. Ook in de andere bijlagen. Er is sprake van hergebruik als dieren meegenomen worden naar een andere aanvraag, wat hier niet het geval is.

Aangepast.

Niet Technische Samenvatting

- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren: als de solitaire huisvesting van toepassing is dan ook graag toevoegen aan de NTS.

Toegevoegd aan de NTS: Waterrestrictie en solitaire huisvesting.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum tweede ronde vragen: 20-01-2021
- Datum antwoord: 10-02-2021
- Gestelde vragen en antwoorden:

Bijlage 1

- B. De dieren: In bijlage 1 zijn 1596 dieren nodig en dat is het aantal dieren dat aan het eind van het experiment over moet zijn (dus 95% van het oorspronkelijk aantal). Daarom moet 1596 worden gedeeld door 0,95 en dus niet $1596 \times 1,05 = 1676$. Overigens staan nu in bijlage 1 onder B (1675+369) en onder K (1676+370) net niet gelijke aantallen dieren. Een en ander moet nog worden gecorrigeerd, gelijkgetrokken en in de NTS aangepast.

Stomme fout, aangepast onder B, K en in de NTS.

- B. De dieren: Bij de correctie van het aantal benodigde moedermuizen voor de 10% die niet drachtig raakt, wordt dezelfde bovengenoemde fout gemaakt. Als er 335 nesten jonge muizen nodig zijn, moeten er $335/0,9=372,2$ (afgerond 373) moedermuizen worden ingezet/bevrucht en niet $335 \times 1,1 = 368,5$ (afgerond 369). Graag nog aanpassen.

Idem, aangepast.

- B. De dieren: De DEC lijkt te kunnen opmaken uit bijlage 1 dat de moederdieren fokmuizen zijn die niets anders ondergaan dan (lichte?) nestverstoring. Maken de moederdieren dan toch deel uit van de dierproef? Als dat wel het geval is, moet er dan niet vermeld worden dat de moederdieren na de proef fokmuizen blijven? Deze dieren worden toch niet geëuthanaseerd?

Ik heb dit toegevoegd. Hierdoor verandert ook C. Hergebruik. Hier heb een opmerking van dezelfde strekking geplaatst.

- F. Huisvesting en verzorging: De DEC heeft toch nog vragen over de solitaire huisvesting. De DEC maakt uit de tekst op dat de experimenten in bijlage 1 en 2 hetzelfde zijn (nadat manipulatie van hersenverbindingen heeft plaatsgevonden). Dit leest zij in de volgende zin onder 3.4.1: 'Om een goed beeld te krijgen van hoe verschillende manipulaties een impact

hebben op de anatomie van hersenverbindingen, gebruiken we dezelfde experimenten als beschreven onder stap 1.1 en 1.2 (zie ook Tabel 3). De beschrijving van de solitaire huisvesting in tabel onder K tussen bijlage 1 en 2 verschilt echter per bijlage. Kunt u dit uitleggen of aanpassen?

De experimenten (bepaling van anatomie, gedrag, expressie en in vivo en in vitro elektrofysiologie) zijn hetzelfde, maar door de manipulaties van hersenverbindingen kunnen er verschillen optreden in bijvoorbeeld de lengte van een proef. Ik heb de twee stukken tekst zo veel mogelijk gelijkgetrokken om verwarring te voorkomen. Zie extra tekst onder F in bijlage 2.

Bijlage 2

- F. Huisvesting en verzorging: Onder punt 2 noemt u 200 dagen solitaire huisvesting. Dit aantal lijkt niet helemaal te kloppen. Implantaten worden volgens de beschrijving in beide bijlage tussen p21 en p60 geplaatst. De maximale duur van de proef is volgens bijlage 1 189 dagen en volgens bijlage 2 240 dagen. Dus de maximale duur van de solitaire huisvesting in verband met de headplates zou voor bijlage 1 189 (duur proef) - 21 (leeftijd implantaatplaatsing) = 168 dagen moeten zijn. Dat wordt ook aangegeven. Maar voor bijlage 2 komt de DEC uit op 240-21 = 219 dagen. Graag nog narekenen en aanpassen. *Klopt inderdaad. Ik heb zitten puzzelen waar die 200 dan vandaan komt, maar kan dat niet meer traceren in de tekst. Ik denk dat het een overblijfsel is van een vorige versie. Excuses voor de verwarring.*
- 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 vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

De ontwikkeling van de hersenen vindt bij de mens vóór en na de geboorte plaats. Voor de geboorte worden de hersenstructuren aangelegd, en na de geboorte vindt verfijning plaats van verbindingen tussen structuren. Vroege hersenschade door (lokaal) zuurstoftekort tijdens of rondom de geboorte heeft tot gevolg dat verfijning van verbindingen niet goed verloopt met hersenaandoeningen tot gevolg. Wereldwijd loopt bijna 1 op de 100 kinderen bij de geboorte een vorm van hersenschade op. Van deze groep ontwikkelt een kwart blijvende neurologische schade, welke zich o.a. kan manifesteren in de vorm van autisme, epilepsie, cerebrale parese en/of cognitieve problemen. Patiënten hebben te maken met een verminderde levenskwaliteit

en zijn in sommige gevallen zelfs aangewezen op levenslange verzorging. De mogelijkheden om patiënten te behandelen/ondersteunen zijn zeer beperkt.

Er zijn recente aanwijzingen dat verbindingen van en naar de kleine hersenen cruciaal zijn voor verschillende hersenfuncties, en mogelijk een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van eerdergenoemde hersenaandoeningen door vroege hersenschade. Gedetailleerde pathofysiologische kennis met betrekking tot deze hersenverbindingen ontbreekt echter nog. Met het voorliggende project wil de aanvrager daarom in kaart brengen wat de rol is van verbindingen van en naar de kleine hersenen in het ontstaan van vroege hersenschade, en aan de hand daarvan een causale en mechanistische verklaring opstellen voor gedragsveranderingen zoals die gezien worden in patiënten met vroege hersenschade. Aan de hand van deze inzichten zal het in de toekomst mogelijk zijn om gericht(er) patiëntgebonden onderzoek te doen en toe te werken naar verbeterde therapieën en interventies.

Met behulp van twee gevalideerde muizenmodellen voor vroege hersenschade zal worden onderzocht welke anatomische veranderingen optreden bij het aanleggen/verfijnen van hersenverbindingen, in hoeverre dit invloed heeft op het functioneren van de verbindingen, en welke gedragsveranderingen dit tot gevolg heeft bij de muizen.

De opzet van het project is helder en komt het meest overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking invulling definitie project' (voor nadere toelichting zie C8). Het is navolgbaar aan welke experimentele procedures de dieren zullen worden onderworpen en welk ongerief daarmee gepaard gaat. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat 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. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het opstellen van een causale en mechanistische verklaring voor gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade. Het uiteindelijke doel van het project is om met behulp van de opgedane kennis betere therapieën en interventies te ontwikkelen en daarmee de levenskwaliteit van patiënten met vroege hersenschade te verbeteren. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld en de behoeften vanuit de kliniek.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers, de patiënten die lijden aan de gevolgen van vroege hersenschade, en het onderzoeksveld.

Gezondheid, welzijn en integriteit van de dieren worden aangetast. De meeste proefdieren zullen als gevolg van de verschillende experimentele handelingen (waaronder het induceren van vroege hersenschade) matig ongerief ondervinden. Alle overige dieren zullen licht of ernstig ongerief ondervinden (voor nadere toelichting zie C11). De dieren hebben er groot belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker en de betrokken organisatie zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient.

Voor patiënten met vroege hersenschade is dit onderzoek op termijn van belang. Resultaten uit het voorliggende project kunnen op termijn leiden tot verbeterde interventies en therapieën.

Dat zou de levenskwaliteit van patiënten (en hun naasten) aanzienlijk kunnen verbeteren. Uiteraard heeft ook de samenleving hier baat bij – zeker met het oog op de relatief hoge incidentie van hersenaandoeningen ten gevolge van vroege hersenschade.

Voor het onderzoeksveld is dit project van belang, omdat het waardevolle inzichten zal opleveren over de rol van de kleine hersenen en betrokken hersenverbindingen in de ontwikkeling van hersenaandoeningen na vroege hersenschade (in het verleden ging de aandacht binnen de neurowetenschap vooral uit naar de grote hersenen).

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep van de aanvrager heeft uitgebreide ervaring met de beschreven hersenschade-modellen en de te gebruiken technieken en apparatuur. Er is nauwe samenwerking met relevante (pre)klinische afdelingen, waardoor het vertalen van klinische inzichten/data naar dierexperimenten enerzijds, en het voortborduren op inzichten uit dierexperimenteel onderzoek in specifiek en doelgericht patiëntgebonden onderzoek anderzijds, gewaarborgd is. De DEC waardeert deze zogenaamde *shuttle-approach*, die in belangrijke mate zal bijdragen aan het behalen van het uiteindelijke doel van het project.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project (zie ook C1). De aanvrager heeft met behulp van figuren, tabellen en een hele reeks voorbeelden inzichtelijk gemaakt hoe de experimenten worden opgezet en op welke wijze de dierproeven bijdragen aan de beantwoording van de verschillende onderzoeksvragen. In de projectbeschrijving is een duidelijke beslisboom opgenomen inclusief go-/no-go momenten. Met de experimenten uit bijlage 1 worden verschillen tussen muizen mét en zonder geïnduceerde hersenschade in kaart gebracht, waarbij gekeken zal worden naar anatomie, elektrofysiologie, genexpressie en gedrag. Met behulp van de experimenten uit bijlage 2 worden geconstateerde verschillen in muizen en/of kinderen (dus volgend uit dierexperimenteel onderzoek zoals beschreven in bijlage 1 en/of uit patiëntgebonden onderzoek) nader onderzocht door hersenverbindingen van en naar de kleine hersenen te manipuleren, en de muizen vervolgens aan dezelfde reeks analyses te onderwerpen als in bijlage 1 (zie figuur 4). De rol van bijlage 3 binnen het project wordt in de projectbeschrijving weliswaar niet uitgebreid beschreven (alleen in de legenda van de tabellen 2 en 4 in de projectbeschrijving), maar wordt in combinatie met de beschrijving van de experimenten in de bijlage zelf wél voldoende duidelijk. Met behulp van de experimenten in bijlage 3 wordt voorafgaand aan de eigenlijke dierproeven bepaald welke (combinaties van) muizenlijnen geschikt zijn voor de beoogde experimenten, en of er sprake is van meer dan licht constitutioneel ongerief. Dieren waarbij meer dan licht constitutioneel ongerief dreigt op te treden worden geëuthanaseerd, en de betreffende muizenlijnen zullen – ook wanneer ze op grond van de uitgevoerde karakterisatie geschikt bevonden werden – niet ingezet worden voor de experimenten uit de bijlagen 1 en 2.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden grotendeels gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn, maar een deel van de dieren zal solitair gehuisvest moeten worden. Moederdieren worden enkele dagen prepartum solitair gehuisvest,

zodat het tijdstip waarop de pups geboren worden exact kan worden vastgesteld (bijlage 1). Voor enkele gedragsstudies is het noodzakelijk dat muizen voorafgaand aan een experiment tijdelijk een aantal uren geen toegang hebben tot water (bijlagen 1 en 2). Tot slot kan het nodig zijn om dieren solitair te huisvesten om schade aan een aangebracht implantaat te voorkomen. De maximale duur van solitaire huisvesting in dergelijke gevallen bedraagt 168 dagen (bijlage 1) en 219 dagen (bijlage 2). Gebaseerd op eerdere ervaringen gaat men ervan uit dat dit bij maximaal 30% van de dieren met een implantaat nodig zal zijn. In de ogen van de DEC rechtvaardigt de meerwaarde van de experimenten die met behulp van de implantaten uitgevoerd kunnen worden (*in vivo* elektrofysiologie) het ongerief dat gepaard gaat met de eventuele langdurige solitaire huisvesting.

11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De aanvrager heeft zeer gedetailleerd uiteengezet welk ongerief de verschillende experimentele handelingen tot gevolg hebben, en inzichtelijk gemaakt hoe de inschatting van het ongerief voor de verschillende groepen dieren tot stand is gekomen. De moederdieren uit bijlage 1 (8% van het totaal aantal dieren) zullen licht ongerief ervaren ten gevolge van de nestverstoring die optreedt, wanneer pups tijdelijk uit het nest genomen worden ten behoeve van een experiment. Van de muizenpups uit de bijlagen 1 en 2 zal het merendeel (78% van alle dieren uit dit project) matig ongerief ervaren als gevolg van de verschillende experimentele handelingen. De overige muizenpups uit deze bijlagen (3% van alle muizen uit dit project) kunnen cumulatief ernstig ongerief ervaren door de (onvermijdelijke) combinatie van verschillende experimentele handelingen (welke opzichzelfstaand matig ongerief tot gevolg hebben). Voor alle muizen uit bijlage 3 (11% van het totaal aantal dieren) wordt het ongerief ingeschat als licht, omdat zij mogelijk te maken krijgen met constitutioneel ongerief. Voor alle bijlagen geldt dat beweging en gedrag belangrijke experimentele uitkomstparameters zijn, en dat de onderzoekers derhalve (ook buiten de reguliere controles om) een goed beeld hebben van de gezondheid en het welzijn van de muizen. Dat zal in de ogen van de DEC eraan bijdragen dat onverwacht ongerief tijdig opgemerkt wordt.
12. Voor alle dieren geldt dat hun integriteit wordt aangetast door het instrumentele gebruik dat inherent is aan het verrichten van dierproeven. Daarnaast wordt de integriteit van de meerderheid van de dieren fysiek, mentaal en gedragsmatig aangetast, onder andere door het induceren van vroege hersenschade en het manipuleren van hersenverbindingen.
13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Uit de bijlagen 1 en 2 wordt duidelijk op welke aspecten gelet wordt bij de intensieve monitoring van de welzijns- en gezondheidstoestand van muizen na een operatieve ingreep. Voor het gewichtsverlies geldt dat het humaan eindpunt bereikt is wanneer een dier gedurende 2 dagen meer dan 20% afwijking vertoont ten opzichte van de (gecorrigeerde) normaalcurve. Voor de andere gezondheids- en welzijnsaspecten zijn geen harde criteria genoemd, maar de

DEC gaat er vanuit dat de onderzoekers een adequate inschatting kunnen maken van het optredende ongerief, en conform de geldende richtlijnen (en de vooraf opgestelde werkprotocollen) tijdig in beeld hebben wanneer sprake is van meer dan verwacht (en te rechtvaardigen) ongerief. Gebaseerd op ervaringen met vergelijkbare experimenten houdt men er rekening mee dat maximaal 5% van de dieren het humaan eindpunt zal bereiken. In bijlage 3 wordt onder andere in kaart gebracht of de fok van bepaalde muizenlijnen gepaard gaat met meer dan licht constitutioneel ongerief. Wanneer uit (gedrags-)observaties blijkt dat dieren meer dan licht ongerief dreigen te hebben, dan wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd. Men houdt er rekening mee dat een dergelijke situatie zich bij maximaal 4 van de 25 (combinaties van) muizenlijnen voordoet. Er worden geen concrete criteria genoemd, maar uit de beschrijving van de experimenten uit bijlage 3 maakt de DEC op dat ongerief zich met name zal manifesteren in de vorm van bewegingsproblemen en afwijkend eet-, drink- en sociaal gedrag. Het vaststellen van eventueel constitutioneel ongerief zal in nauw overleg met de IvD plaatsvinden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het project richt zich op de pathofysiologie van vroege hersenschade. Voor dat onderzoeksgebied zijn geen geschikte *in silico* modellen beschikbaar. Fundamentele kennis die daarvoor nodig zou zijn ontbreekt nog en wil men juist met behulp van dit project vergaren. Het is niet mogelijk om de onderzoeksvragen met behulp van *in vitro* experimenten te beantwoorden. Experimenten met celkweken of (humaan) resectieweefsel zouden een te gesimplificeerde weergave van de werkelijkheid bieden, en de onderzoekers niet in staat stellen om de complexe pathofysiologie van vroege hersenschade gedetailleerd in kaart te brengen. Daarnaast zijn gedrag en beweging belangrijke uitleesparameters die waardevolle informatie geven over de betrokken hersenstructuren, en deze kunnen uiteraard alleen *in vivo* in het intacte dier gemeten worden.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De aanvrager geeft in de bijlagen 1 en 2 een gedetailleerde onderbouwing van het aantal dieren dat nodig is voor de verschillende typen experimenten (anatomie, elektrofysiologie, genexpressie en gedrag), het aantal te onderzoeken hersenverbindingen, de te gebruiken technieken voor manipulatie van hersenverbindingen en het aantal groepen per type experiment. De aantallen worden waar mogelijk statistisch onderbouwd op basis van literatuurgegevens en realistische aannames. Het aantal benodigde dieren wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren waar mogelijk voor meerdere experimenten in te zetten, en door een heldere go-/no-go strategie toe te passen. In bijlage 3 wordt aangegeven dat men 25 (combinaties) van muizenlijnen wil onderzoeken. Bij nader inzien is niet geheel duidelijk hoe men dit aantal heeft bepaald, maar de DEC acht het karakteriseren van 25 (combinaties van) muizenlijnen realistisch en in verhouding tot de grote verscheidenheid aan

experimenten die – gebaseerd op de uitkomsten van patiëntgebonden onderzoeken en tussentijdse resultaten uit het dierexperimenteel onderzoek – opgezet zullen worden. Het aantal nesten en dieren per muizenlijn is gebaseerd op poweranalyses en literatuurstudies.

16. Het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Alle gebruikelijke maatregelen (zoals analgesie en anesthesie) ter bestrijding van pijn en stress tijdens experimentele handelingen en chirurgische ingrepen worden toegepast. Voor de gedragsexperimenten wordt gebruik gemaakt van nieuwe technieken waarbij de muizen in een zo natuurlijk mogelijke omgeving geobserveerd worden. Dat komt het welzijn van de dieren en de betrouwbaarheid van de uitkomstparameters ten goede. De experimenten in bijlage 3 dragen bij aan de verfijning van de experimenten uit de bijlagen 1 en 2, doordat geschiktheid en eventueel ongerief van de benodigde en te gebruiken muizenlijnen vooraf in kaart gebracht worden.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Met betrekking tot de pups heeft de aanvrager geen voorkeur voor dieren van een bepaald geslacht. De commissie neemt aan dat dit betekent dat dieren van beide geslachten in gelijke mate zullen worden ingezet voor zover ze in die verhouding beschikbaar zijn. Het spreekt voor zich dat voor de fok meer vrouwelijke dan mannelijke muizen nodig zijn. Overigens worden alleen de moederdieren uit bijlage 1 meegerekend als proefdieren, omdat zij licht ongerief zullen ervaren door de nestverstoring die optreedt tijdens de experimenten in bijlage 1. Voor de moederdieren uit de andere bijlagen geldt dit niet.
19. Het merendeel van de muizen wordt in het kader van het project gedood om de pathofysiologie van vroege hersenschade en het effect van manipulatie van hersenverbindingen in detail te kunnen onderzoeken. De betreffende dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood. De moederdieren uit bijlage 1 worden niet gedood, maar aangeboden voor hergebruik.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing op de pups, aangezien zij gedood worden in het kader van het experiment. De moederdieren uit bijlage 1 worden zoveel mogelijk hergebruikt voor fokdoeleinden.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden, is of het belang van dit onderzoek, dat tot doel heeft met behulp van muizenmodellen een causale en mechanistische verklaring op te stellen voor gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief voor een groot deel van de dieren (78%) en licht (19%) of ernstig (3%) ongerief voor de overige dieren. Het ernstige ongerief is het gevolg van cumulatie van experimentele handelingen die opzichzelfstaand matig ongerief tot gevolg hebben. De dieren hebben er veel belang bij gevrijwaard te blijven van de aantasting van hun welzijn en integriteit, en de commissie kent daar in de ethische afweging veel gewicht aan toe.
Dat het voor de individuele onderzoekers van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.
Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project eraan bijdragen dat inzicht ontstaat in de pathofysiologie van vroege hersenschade, en dat met behulp van de opgedane kennis op termijn betere therapieën en interventies ontwikkeld kunnen worden die de levenskwaliteit van patiënten kunnen verbeteren. Daarmee is dit onderzoek – mede door de inbedding in een klinische setting en het preklinische karakter ervan – van essentieel belang voor toekomstige patiënten met vroege hersenschade. Het project levert ook een waardevolle bijdrage aan de neurowetenschappen, doordat recente fundamenteel-wetenschappelijke inzichten over de rol van de kleine hersenen en betrokken hersenverbindingen nader onderzocht worden. De DEC kent aan beide aspecten van het project (het fundamentele en het translationele aspect) veel gewicht toe.
De DEC acht het aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstellingen van dit project behaald zullen worden, zeker met het oog op de *shuttle-approach*, waarbij bevindingen uit de kliniek leidend zullen zijn voor de invulling van het dierexperimenteel onderzoek, en resultaten uit de dierstudies op relatief korte termijn gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van betere therapieën en interventies voor patiënten. Voor het behalen van de doelstellingen is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het opstellen van een causale en mechanistische verklaring voor gedragsveranderingen in patiënten met vroege hersenschade een essentieel belang vertegenwoordigt, en dat dit essentiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Patiënten die lijden aan de gevolgen van vroege hersenschade zouden er zeer bij gebaat zijn als met behulp van de

resultaten uit het voorliggende project betere therapieën en interventies ontwikkeld kunnen worden die bijdragen aan een verbeterde levenskwaliteit.

De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende aannemelijk gemaakt. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen zal worden dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



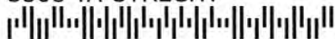
> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

10.2.e. en g

Postbus 80125

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD11500202014370

Bijlagen

3

Datum 29 maart 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e. en g

Op 23 december 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Verbindingen tussen de grote en kleine hersenen en de invloed van vroege hersenschade" met aanvraagnummer AVD11500202014370. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 29 maart 2021 tot en met 1 februari 2026.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

29 maart 2021

Aanvraagnummer:

AVD11500202014370

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 17 februari 2021. Wij hebben de DEC om aanvullend advies gevraagd over onduidelijkheden in de bijlagen. De DEC heeft bemerkt dat de CCD van de DEC de verkeerde versie van de documenten had ontvangen en heeft de meest recente versie gestuurd. Op 23 maart 2021 hebben wij het aanvullend advies van de DEC ontvangen. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 12 maart 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op verduidelijking van de humane eindpunten en het ongerief en het verwijderen van verwijzingen van de bijlagen naar het projectvoorstel. Daarnaast zijn de aantallen dieren in de bijlagen en niet-technische samenvatting met elkaar in lijn gebracht. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2027 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Datum:
29 maart 2021
Aanvraagnummer:
AVD11500202014370

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: Postbus 80125
Postcode en plaats: 3508 TA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 maart 2021 tot en met 1 februari 2026, voor het project "Verbindingen tussen de grote en kleine hersenen en de invloed van vroege hersenschade" met aanvraagnummer AVD11500202014370, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoctoral Researcher. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 23 december 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 26 maart 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Proeven aan dieren van hersenschademodellen, zoals ontvangen op 26 maart 2021;
 - 3.4.4.2 Proeven aan dieren waarin hersenverbindingen worden gemanipuleerd, zoals ontvangen op 26 maart 2021;
 - 3.4.4.3 Testen van geschiktheid van, en ongerief in muizenlijnen, zoals ontvangen op 26 maart 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 26 maart 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 17 februari 2021; Aanvullend advies, zoals ontvangen op 23 maart 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 26 maart 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Proeven aan dieren van hersenschademodellen			
	Muizen (Mus musculus)	2.052	82,0% Matig 18,0% Licht
3.4.4.2 Proeven aan dieren waarin hersenverbindingen worden gemanipuleerd			
	Muizen (Mus musculus)	2.077	7,0% Ernstig 93,0% Matig
3.4.4.3 Testen van geschiktheid van, en ongerief in muizenlijnen			
	Muizen (Mus musculus)	500	16,0% Ernstig 84,0% Licht

Aanvraagnummer: AVD11500202014370

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD11500202014370

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:
AVD11500202014370

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 blijven 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.

Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of 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.zbo-ccd.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'. 10400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Wageningen University
- 1.3 Provide the title of the project. The factors driving cognitive evolution: How do mental abilities evolve?

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic Research
- Translational or applied research
- Regulatory use of routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- 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.

How did the human intellect evolve? Cognitive ability and soft brain tissue does not leave a fossil record, hence understanding the evolutionary processes that underlie variation in cognitive abilities across animal species is key to this question. Indeed, unravelling how cognition, and its neural substrate, the brain, evolves has been at the focus of considerable interest over the last decade. This is manifest by a large number of scientific and popular science publications. Recently, several comparative studies and our own experimental research highlighted the role of predation in the evolution of brain and cognition, a relationship that has previously often been overlooked. It is intuitively reasonable that the cognitive advantage of a larger brain should help to avoid predation. However, it remains unclear whether predation indeed boosts cognitive and brain evolution or how cognition evolves in response to predation. While there is some correlational evidence on this subject, a direct experimental test of this relationship is missing. To draw causal conclusions such direct experiments are needed. Evolution via predation is known to be a major driving force in the natural world. A large number of studies have related predation pressure to many aspects of animal behavior and morphology. However, what is missing to date is experimental evidence directly showing how predation impacts the evolution of behavior, cognition and morphology. Here we plan such an experiment. We will use an artificial selection approach in which those animals that survive the longest in a naturalistic setting including a natural predator will be propagated. Repeating this procedure for several generations and comparing the cognitive abilities of the so created predation-selected fish with control animals will allow us to directly study how cognition evolves when animals adapt to high predation pressure. Additionally, hybridization between closely related species is often a driver of evolution as mixing genotypes has been shown to create evolutionary novelty. Such hybridization as 'engine of evolution' is well established in microbes, as well as in crop and livestock production. We hypothesize that it also plays a role in the evolution of cognition and the brain. We will test this hypothesis by hybridizing closely related species and testing the cognitive abilities of parental species and hybrids. If our hypothesis holds we expect to find increased cognitive abilities in some animals for some cognitive domains. Such 'insular' improvements may then be the substrate on which natural selection can act on during invasion of novel niches and/or speciation. As the genetic bases of cognitive abilities is extremely complex and not well understood, testing these hypotheses in computer models is currently not an option.

The aim of this project is to understand how predation and hybridization impact the evolution of cognition and the brain. We will tackle these questions using the toothcarps (Poeciliidae, also often called livebearers), a well-established fish family in evolution and cognition research that includes guppies, platys and mollys. Strong selection on behavior (via predator pressure) will reveal the

evolutionary trajectories of animals adapting to a specific selection pressure, while experimental hybridization will reveal whether mixing of distant genotypes can indeed create variation in cognition on which natural selection can act on.

3.2 Purpose

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

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

The objective of this project is to investigate why animals behave the way they do – a major challenge in biology. Specifically, this project will use fish as a model to assess the role of predation and hybridization in the evolution of cognitive abilities. It is well known that animal species differ from each other in behavioral repertoire, organ features and cognitive abilities. But we know very little about what is driving the evolution of this variation and how these factors interact. To date most of our knowledge is based on correlative evidence. For instance, it has been shown that often animals from areas with high predation pressure have larger brains than those from areas with lower predation pressure. To conclude that predation pressure, via selection on better cognitive abilities is the driver of this difference is however premature. Several other aspects are also typically different between areas of low and high predation (population density, resource availability, etc.). Hence, to understand causation, an experiment manipulating predation pressure and assessing cognition is necessary. Indeed, understanding causation is a key outstanding research question. This project will enable us to answer this question. This objective is achievable by combining artificial selection for predation survival, experimental hybridization, and several advanced assays of morphology and cognitive abilities.

After collecting evidence from published literature on the effects of naturally occurring differences in predation pressure and hybridization events performing such experiments on live animals will be interesting for basic research. It will also increase our understanding of two factors that we think are vital in the evolution of intelligence. This should ultimately help understand what has shaped our own intellect.

3.3 Relevance

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

This study aims to increase our understanding of the biological processes behind behavior, cognition and morphology. Understanding what determines why animals are so different in what they can mentally do, helps to understand how our evolutionary past has produced our amazing brain. While our research is not designed to have direct applied benefits for humans, animals or the environment, it will increase our understanding of biological processes (behavior, cognitive mechanisms) that can directly inform those working towards applied applications.

The overarching benefit from this research is a better understanding of how cognitive abilities evolve. There is a rich body of literature comparing species with each others and making inferences from such comparisons about how those species differ and how this may have contributed to differences in their cognitive landscape. Such comparative studies are great to learn about general evolutionary patterns, but they have one major caveat – they do not allow for causal conclusions. They are correlational. This project will allow for causal conclusions as predation pressure and hybridization events are experimentally induced.

Predation selection -Humans have removed most of the apex predators in a lot of ecosystems. This led to human-induced evolution in prey animals. Relaxed predator-driven selection for some aspects of cognition has the potential of shaping ecosystems on a large scale. Our research will contribute to our understanding of how loss of predators can have downstream effects on the key traits essential to cope with environmental challenges in prey species. By highlighting the important role of predators in ecosystems, we can provide arguments in favor of conserving apex predators and for instance, contribute to the ongoing debate about the return of large predators to Central Europe This can profoundly impact policies and advance environmental sustainability by mitigating the influence of human activities on ecosystems. Additionally, the results of this project can have implications for several other areas of research. For instance, understanding the behavioural changes during compensatory stocking is key in managing natural populations as the detrimental effects of domestication selection during captive breeding have recently been identified as a major threat to biodiversity (Araki et al. 2007; Christie et al. 2016) . Our advances in predator driven brain evolution will facilitate the development of novel approaches to ameliorate those negative effects, which are most prominent in the compensatory stocking in Salmonid species. A period of natural selection could be included in the rearing of hatchery fish. Natural predation shall purge 'unfit' genotypes from populations. Additionally, via bystander effects, natural predation would facilitate future predator evasion in surviving fish. Both, decreasing the frequency of unfit genotypes, and boosting anti-predator skills are expected to increase the survival of released hatchery fish. In fact, our team has applied for funding to test this approach in a seminatural setting. Collaborators are several Fisheries Research Station and an expert in fish conservation and management of aquatic ecosystems.

Hybridization – It has recently been suggested that hybridization can act as an engine for the evolution of cognitive novelty (Rice 2020). Here we test this idea. This is a question of basic research and of extending our knowledge about how cognition evolves. Especially in the light of recent ancient DNA findings of frequent hybridization events between hominid lineages (Popadin et al. 2017, Nygren 2018, Slon et al. 2018), the role of hybridization in cognitive evolution needs to be studied experimentally to ultimately help understand the evolution of our own intellect.

Methodology -Our novel methods of testing individual cognitive abilities of an unprecedentedly high number of individuals in a short period of time will be of interest to researchers in other fields such as experimental psychology or ecotoxicology.

3.4 Research Strategy

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

We will test the role of predation and hybridization in the evolution of cognition and the brain experimentally by combining three major approaches: 1) Artificial selection for predation survival, 2) Experimental hybridizations of closely related species, 3) Detailed cognitive and morphological assays. This will allow us to address our two main questions:

1) How does predation pressure drive the evolution of morphology and cognition? To experimentally determine the influence of differential predation on evolutionary patterns we will use artificial selection on predator survival of guppies (*Poecilia reticulata*) over two generations. We will then assay the offspring of the 2nd generation fish for behavioral, cognitive and anatomical differences to quantify how predation drives their evolution. Our previous artificial selection experiments in guppies have shown that strong selection leads to a remarkably fast evolutionary response after already two generations. For instance, guppies evolve 12 % larger brains after two generations of brain size selection (Kotrschal et al. 2013). This approach will allow us for the first time to experimentally test which aspects of cognition evolve under predation pressure and how this is linked to changes in morphology such as the brain.

2) Can hybridization be a driver of cognitive evolution? To investigate the effects a mixing of the genotypes of closely related species has on the cognitive landscape of hybrid offspring we will hybridize several species pairs of Poeciliidae. We will then assay the hybrids and the parental species (from outbred aquarium lines) in several crucial cognitive domains to quantify how hybridization affects cognitive abilities. These experiments will allow us to test our novel hypothesis of hybridization as engine for cognitive evolution.

In this project we will first create animals with a divergent evolutionary background (via artificial selection or hybridization) and then test how this affects their cognitive and brain morphological features.

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.

Artificial selection for predation survival - By breeding only those fish that have survived exposure to predation we can mimic predator-driven evolution and investigate how predation selection drives the evolution of behavior, cognition and morphology. Predators will non-randomly remove a large part of the guppy population (those that are least adapted to evade predation), giving the potential for predation-driven evolution to occur. Comparing predation-selected fish to control lines (randomly picked animals from the same base population that are kept in predation tanks, but safe from predation) will give insights into predation-driven evolution. Control lines are necessary as indirect effects of predator exposure can impact several traits across generations. To experimentally identify how predation impacts the evolution of behavior, cognitive abilities, and

morphology it is important to mimic the natural situation for guppies as close as possible. We will set up large semi-natural tanks ('ponds') with ample hiding opportunities and a pike cichlid (*Crenicichla* sp.), a common major natural guppy predator. The ponds will be stocked with animals from our breeding stocks at the facility, some of which will be placed in a smaller tank within the ponds to prevent their predation. The last survivors of the ponds will be propagated to form the high-predation line. The animals from the small tanks will be propagated to form the control line breeding pairs. Predation selection will be repeated over two generations in three replicates and the offspring of the last generation will be used in the assays.

Hybridization – By experimentally hybridizing closely related species we can mimic hybridization events and test the effects of mixing distantly related genomes on the evolution of behavior, cognition and morphology. To be able to draw general conclusions from our results we need to hybridize several species pairs, of which some hybridize readily (*Poecilia reticulata*, *P. wingei*, *Gambusia affinis*, *G. holbrooki*). However, other species pairs hybridize only very rarely naturally (*Xiphophorus maculatus*, *X. helleri*). This is mostly due to incompatible mating behaviors. This may be tackled by pairing a very large number of one species' males with a very large number of the other species' females. However, to drastically decrease the number of experimental animals necessary, we will aid overcoming the behavioral barrier by artificial insemination. This includes obtaining sperm from one species' males, which is then inserted into the other species' females. Note that, although hybridization events may seem scarce in nature, they do not need to occur frequently to have evolutionary potential. Evolution often acts on minute fitness differences and rare chance events (Stearns 1992). The obtained hybrid offspring will be used in the assays.

Assays – We will use several assays to test for differences in behavior, cognition, and morphology in the experimental animals. By using the same animal in a range of different tasks we will achieve an integrated picture of how phenotypes evolve. By using the same tests for hybrids and selection line fishes we will further be able to contrast the effect of strong directional selection vs. a haphazard mixture of genotypes.

Swimming behavior - Fish will be observed to determine their swimming behavior in swimming assays. Fish will be placed solitarily and in groups in tanks and we will then film their movements under even light conditions. Both sides of those tanks can be fenced off by glass or mesh to present conspecifics or predators. This will allow to test for social preference, mate choice, foraging behavior, and anti-predator behavior such as evasion or predator inspection.

Swimming performance – We will assay swimming performance in a swim tunnel. By incrementally increasing water velocity we will be able to determine swimming speed and endurance.

Cognition – Cognition consists of several domains, such as perception, learning and memory (i.e. processing, storage and retrieval of information). Often cognitive abilities in one domain are not strongly related to cognitive abilities in another domain. Instead of one measure for 'general intelligence' we need to assay several aspects of cognition to understand the effects our experimental manipulations have on the multidimensional 'cognitive landscape' of animals.

Perception – It is paramount to test how animals perceive their world when developing adequate tests of learning and memory. Visual abilities will be tested using an **optomotor test**. This assay makes use of the fact that fish follow slowly moving vertical lines. By manipulating the size, or distance to those lines, or the color contrast between those lines we can test visual acuity and color perception. We will measure time that individual fish spends circling in the same direction as a clockwise rotational stimulus (vertical stripes) projected on the walls of a round white arena.

Chemoreception will be tested in a two-channel **flume chamber**. In this chamber a laminar flow of two different concentrations of relevant chemical cues (smell of food, mates, or predators) can be presented and the focus fish can move freely between them. By observing positioning of the fish while manipulating concentration and presentation sequence of those chemical cues we can determine their chemoreceptive abilities. Importantly, this assay also allows to test for preference.

Learning & Memory – When animals learn, they adjust their behavior to previous experience. We will test how well they can do this using a standard **manual testing apparatus**. Fish will be kept in individual tanks. Fish are trained to find food in holes of plates that are covered by discs. The fish will dislodge the disks to find the food reward. The color and positioning of the discs can be varied to test for color and spatial learning by determining their speed and accuracy at which animals learn that the reward is hidden under a certain disk. By retesting animals in a previously learnt paradigm in the above described apparatus after standardized time periods we can test memory ability. Do animals still remember which stimulus is associated with food? This approach is low tech, but very labor intensive and demands direct contact with the animals. We will hence supplement it with an **automated testing apparatus**. Briefly, the apparatus consists of a holding tank with two LCD displays on opposite ends, a webcam mounted above the tank, two modified feeder devices on either end of the tank above the LCD screens, and two microcomputers that coordinate all the components and track fish movements from the video recordings. Following each stimulus presentation on the LCD displays, a tightly packed food ball enclosed in mesh netting is lowered in front of the positive stimulus and a marble of similar dimensions is lowered in front of the negative stimulus; the fish are given some time to nibble on the food reward, then the stimuli disappear from the display and both bobbins are lifted out of the water. The sequence of stimuli displayed on either screen and the lowering of feeder bobbins is pre-programmed and controlled by the microcomputers. The tracking software will monitor positioning of the fish and based on a predefined learning criterion the next learning paradigm can be started. Increasingly challenging learning paradigms can sequentially be tested. This will yield the detailed high-quality learning data necessary to meaningfully assess the cognitive landscape of predation-selected and hybrid fishes.

Morphology – To determine morphological features such as body form or coloration we will take a picture from either side of anaesthetized animals. Fish under different selection pressures can change investment into different organs (trade-offs). To investigate such differences in investment we will sacrifice individuals for some experiments and dissect out all internal organs, which will be anatomically assayed. We will determine brain anatomy to relate changes in the brain to changes in cognitive abilities and we will determine the size of the internal organs to investigate potential trade-offs between organs.

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

This project is set up to achieve an integrated, coherent picture of the factors behind cognitive evolution and how other traits coevolve along the way. We chose one approach to decrease variation in genotypes via strong selection on antipredator survival and another complimentary approach to increase variation in genotypes on which natural selection can then act upon. The two breeding set ups (artificial selection and hybridizations) are vital to create the experimental animals, which we will then assay in the second step. Artificial selection (referred to as first experiment) and hybridization (referred to as second experiment) will be done in parallel. Artificial selection will roughly take 8-10 months per generation, which means that cognitive assays will start at the end of the second year and continue until the fifth year. This is feasible as guppies in the laboratory show little signs of ageing until 3.5 years of age. Hybrids will be adult within one year, hence the assays of those will already start in the second year and continue until the fifth year. The broad range of assays is necessary as trade-offs are likely in such experiments. For instance, divergence of energy into one trait (i.e. cognitive predator evasion skills, better brains) may decrease the energy available for other traits (i.e. muscle mass, swimming performance). Currently we can only speculate about those scenarios and how traits interact in evolving phenotypes. With the planned assays we will be able to answer these questions.

Milestones

1. Experimentally testing how predation selects for cognitive abilities, behavior and morphology. This is exciting as to date there is large body of literature highlighting such a link, but direct experimental evidence that allows to infer *causation* is lacking. Please note that experiments that have added predators to populations of animals have been performed before (for instance Endler 1980). However, those were *experimental evolution* studies that did not control for factors such as population density, food availability, growing up under predator threat or maternal effects. Here we aim at testing specifically the effect of predator evasion ability on the evolution of cognition. This has not been done before.
2. Testing our novel hypothesis that hybridization can act as an 'engine' for cognitive evolution. This will yield important insights into cognitive evolution - whether our data support this hypothesis or not.

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	Artificial selection mimicking natural selection
2	Hybridization of closely related Poeciliidae
3	Common experimental procedures

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD10400202010625
2. Titel van het project: The factors driving cognitive evolution: How do mental abilities evolve?
3. Titel van de NTS: De factoren die cognitieve evolutie aansturen: hoe evolueren mentale vermogens?
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
10.2 .e. en g
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 10-8-2020
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 24-08-2020 (geagendeerd voor 17-08-2020, maar door te volle agenda doorgeschoven naar ingelaste vergadering 24-08-2020) en 21-9-2020 (in bijzijn van onderzoeker)
Anderszins behandeld: n.v.t.
Termijnonderbreking(en): 28-08-2020 t/m 03-09-2020 en 21-9-2020 t/m 22-9-2020
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: 22-9-2020 CCD geïnformeerd over vertraging.
Aanpassing aanvraag: 22-09-2020
Advies aan CCD: 24-09-2020
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager
n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vraag: 28-08-2020
Datum antwoord: 03-09-2020

1. For the experiments with the aim to study short term evolution, one could compare hunted animals versus non-hunted animals. What would be the control group using the hybrid fish offspring?

In the hybridization project we are investigating whether hybridization can act as an 'engine' for cognitive evolution. If our hypothesis holds, we expect to find a change in cognitive landscape in some individuals, most likely in one or a few cognitive domains. We hence expect to find an increased variance in the hybrids compared to the parental species. So the control groups will be the parental species. Please not that we are not comparing mean performance levels between parental species and hybrids. We are rather looking for individuals that show distinct cognitive landscapes, which are responsible for the expected greater variance in hybrids.

2. The Table listed on page 19/22 is difficult to interpret, with high numbers of fish. This table might be more elucidated or rewritten to clarify?

We agree that this table is very dense in information. The first column gives the animal numbers required for assays of the predation selection experiment, the other columns the numbers for the hybridization experiment. One potential source of confusion may be the superscript numbers. We chose this approach to indicate which animals are used multiple times in multiple assays. For instance,

DEC-WUR

DATUM
24 september 2020

ONDERWERP
Reactie DEC-WUR
AVD10400202010625

POSTADRES
Postbus 9101
6700 HB Wageningen

INTERNET
www.WUR.nl

CONTACTPERSOON
10.2 .e. en g

TELEFOON
10.2 .e. en g

E-MAIL
DEC@wur.nl

the 96¹ animals are first size measured during their juvenile period (Procedure L), then anaesthetized as adults (procedure A) to determine adult morphology measured (Procedure J) and finally euthanized to measure the organs (Procedure K). Or the 3³ fish are used to obtain predator cues (Procedure C), but they are also anaesthetized before that (Procedure A). The 144² animals are assayed in several behavioral assays to get an integrated picture of their cognitive landscape (Procedures B, D, E, F, G, I). The 500 animals are only used in procedure H. This gives a total number of 96 + 3 + 144 + 500 animals for this first column. → 743 in total. The other columns are all for animals from the hybridization experiment and can be read analogously. Those other columns always give first the two parental species, then the hybrid species with father from one, mother from the other species, then vice versa. So this gives four columns per hybrid pair → 12 columns for three hybrid pairs. To clarify this in the proposal I could add these explanations.

3. In the discussion we would appreciate to focus on the benefit of this research, since we do not understand how this could contribute to the understanding cognitive evolution? We know from farm management that selective breeding will contribute to improved production / higher number of litter, robustness of animals. Please elucidate how the effects of selective breeding / hybridization in fish would contribute to understand evolution?

The overarching benefit from this research is a better understanding of how cognitive abilities evolve. There is a rich body of literature comparing species with each other's and making inferences from such comparisons about how those species differ and how this may have contributed to differences in their cognitive landscape. Such comparative studies are great to learn about general evolutionary patterns, but they have one major caveat – they do not allow for causal conclusions. They are correlational. This project will allow for causal conclusions as predation pressure and hybridization events are experimentally induced.

Predation selection - Humans have removed most of the apex predators in a lot of ecosystems. This led to human-induced evolution in prey animals. Relaxed predator-driven selection for some aspects of cognition has the potential of shaping ecosystems on a large scale. Our research will contribute to our understanding of how loss of predators can have downstream effects on the key traits essential to cope with environmental challenges in prey species. By highlighting the important role of predators in ecosystems, we can provide arguments in favor of conserving apex predators and for instance, contribute to the ongoing debate about the return of large predators to Central Europe. This can profoundly impact policies and advance environmental sustainability by mitigating the influence of human activities on ecosystems. Additionally, the results of this project can have implications for several other areas of research. For instance, understanding the behavioral changes during compensatory stocking is key in managing natural populations as the detrimental effects of domestication selection during captive breeding have recently been identified as a major threat to biodiversity (Araki et al. 2007; Christie et al. 2016). Our advances in predator driven brain evolution will facilitate the development of novel approaches to ameliorate those negative effects, which are most prominent in the compensatory stocking in Salmonid species. A period of natural selection could be included in the rearing of hatchery fish. Natural predation shall purge 'unfit' genotypes from populations. Additionally, via bystander effects, natural predation would facilitate future predator evasion in surviving fish. Both, decreasing the frequency of unfit genotypes, and boosting anti-predator skills are expected to increase the survival of released hatchery fish. In fact, I (AK) have applied for funding from the Swedish Formas (2017-00740) to test this approach in Swedish Salmon in a seminatural setting. Collaborators are Dr. Ann-Britt Florin, head of the Älvkarleby SLU Fisheries Research Station and an expert in fish conservation and management of aquatic ecosystems, and Prof. Erik Petersson, expert in Aquatic Ecology with special research focus on compensatory stocking, especially in salmonid fishes.

Hybridization – It has recently been suggested that hybridization can act as an engine for the evolution of cognitive novelty (Rice 2020). Here we test this idea. This is a question of basic research and of extending our knowledge about how

cognition evolves. Especially in the light of recent ancient DNA findings of frequent hybridization events between hominid lineages (Popadin et al. 2017, Nygren 2018, Slon et al. 2018), the role of hybridization in cognitive evolution needs to be studied experimentally to ultimately help understand the evolution of our own intellect.

Methodology - Our novel methods of testing individual cognitive abilities of an unprecedentedly high number of individuals in a short period of time will be of interest to researchers in other fields such as experimental psychology or ecotoxicology.

DATUM
24 september 2020

PAGINA
3 van 6

4. Would hybrid breeding result in non-fertile offspring like the breeding of horses and donkeys?

All of the here suggested species pairs are known to produce fertile offspring (Schultz 1969). Infertility can occur, but not expected to be the general pattern. For hybridization to play a role in cognitive evolution at least some hybrids need to be fertile and either pair with other hybrids of similar cognitive landscape or backcross to one of the parental species. Infertile animals would be evolutionary dead ends. As specified above evolution can work via small changes of very rare events. Hence it is sufficient when the combination of fertility and changed cognitive landscape occurs infrequently. Even in the case of mules/hinnies (horse x donkey crosses) cases of successfully reproducing hybrids have been documented (Zong & Van 1989).

5. What is the difference between breeding with strict tests (for generations!) of livestock and companion animals, and your naturalistic selection criterion by predation as driving force? Does the former also contribute to evolution?

In animal breeding typically parental animals are selected based on the desirable trait. This trait can be measured, and animals paired accordingly. Our naturalistic selection procedure is similar, but the method of measuring the trait we are interested in (adult survival) is special, as it is confrontation with a live predator. The survivors are the animals that show the desirable trait (they are still alive) and they are paired. I would argue that both approaches are evolutionary processes as evolution is the change in heritable characteristics of biological populations over successive generations (Hall & Hallgrímsson 2008).

References

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J., Bierne, N., ... & Butlin, R. K. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of evolutionary biology*, 26(2), 229-246.
- Burkart, J.M., Schubiger M.N., van Schaik C.P. (2017) The evolution of general intelligence. *Behavioral and Brain Sciences* 40.
- Conner, J.K. (2003) Artificial selection: A powerful tool for ecologists. *Ecology*, 84, 1650-1660.
- Deacon, A.E., Ramnarine, I.W. Magurran, A.E. (2011) How reproductive ecology contributes to the spread of a globally invasive fish. *Plos One*, 6.
- Ender, J. A. (1980) Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 34, 76-91.
- Hall, B. K., Hallgrímsson, B. (2008). *Strickberger's Evolution* (4th ed.). Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.
- Kanazawa, S. (2004). General intelligence as a domain-specific adaptation. *Psychological review*, 111(2), 512.
- Kotrschal, A., Lievens, E. J., Dahlbom, J., Bundsen, A., Semenova, S., Sundvik, M., Maklakov, A.A., Winberg, S., Panula, P., Kolm, N. (2014) Artificial selection on relative brain size reveals a positive genetic correlation between brain size and proactive personality in the guppy. *Evolution*, 68, 1139-1149.
- Kotrschal, A., Rogell, B., Bundsen, A., Svensson, B., Zajitschek, S., Brännström, I., Immler, S., Maklakov, A.A., Kolm, N. (2013) Artificial selection

on relative brain size in the guppy reveals costs and benefits of evolving a larger brain. *Current Biology*, 23, 168-171.

-Kotrschal, A., Zeng, H.L., van der Bijl, W., Öhman-Mägi, C., Kotrschal, K., Pelckmans, K., Kolm, N. (2017) Evolution of brain region volumes during artificial selection for relative brain size. *Evolution*, 71(12), 2942-2951.

-Nygren, J. (2018) Introgression from Gorilla caused the Human-Chimpanzee split. No. e27134v3. *PeerJ Preprints*, 2018.

-Peterson, A., Harpke, D., Peruzzi, L., Levichev, I.G., Tison, J.M., Peterson, J. (2009) Hybridization drives speciation in *Gagea* (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 278(3-4), 133-148.

-Popadin, K. et al. (2017) Mitochondrial pseudogenes suggest repeated inter-species hybridization in hominid evolution. *BioRxiv*: 134502.

-Rice, A. M. (2020) The Overlooked Influence of Hybridization on Cognition. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8 (2020): 39.

-Schultz, R.. (1969) Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *The American Naturalist* 103.934: 605-619.

-Slon, V., Mafessoni, F., Vernot, B., de Filippo, C., Grote, S., Viola, B., et al. (2018). Denisova 11: The daughter of a Neandertal and a Denisovan. In T. A. Klimenkova (Ed.), *The origins of the Upper Paleolithic in Eurasia and the evolution of the genus Homo: Proceedings of the International Symposium (Denisova Cave, Altai, Russia, July 2-8, 2018)* (pp. 82-86). Novosibirsk: IAET SB RAS Publishing.

-Stearns, S.C. (1992) *The evolution of life histories*: Oxford University Press Oxford.

-Stelkens, R., Seehausen, O. (2009) Genetic distance between species predicts novel trait expression in their hybrids. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(4), 884-897.

-Zong, E., Fan G. (1989) The variety of sterility and gradual progression to fertility in hybrids of the horse and donkey. *Heredity* 62.3 (1989): 393-406.

Datum vraag: 21-09-2020

Datum antwoord: 22-09-2020

- There seems to be a discrepancy between the male/female ratio on page 8 and 10 of the DAP: On page 8: "...with four females of one species and three males of the other species..." and on page 10: "...ration (more males than females) and...". Could you please check and clarify?

That discrepancy is due to a typo. The sentence on page 10 should say "more females than males". This is a standard way of minimizing sexual harassment.

- We were wondering: are the predator fish male or female? And why? *The predators can be either males or females. They are a sexually monomorphic species and when kept alone not expected to show differences in behavior. Especially not in hunting or feeding techniques. We will however aim to use only males for our experiments. Those are also the sex we have access to in large enough quantities. Females can be difficult to obtain from the aquarium trade.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC):

n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. N.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft als doel om meer inzicht te krijgen in hoe intelligentie in vissen evolueert. De onderzoeksvraagstellingen zijn helder omschreven, en vertonen een duidelijke samenhang.
2. De DEC signaleert geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op gezondheid en het welzijn van dieren of het voortbestaan van de soort, die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de doelstellingen. Het is een mooi, gebalanceerd voorbeeld van basaal wetenschappelijk onderzoek. De aanvraag volgt voorbeeld 4B uit de handreiking definitie project.

DATUM
24 september 2020

PAGINA
5 van 6

Belangen en waarden

4. Het project kent een tweetal deelonderzoeken die voldoende samenhang vertonen. Het doel van het project is vergaren van kennis hoe predatie en hybridisatie invloed hebben op de cognitieve evolutie van guppen die predatie overleven. De overlevende guppen worden gebruikt voor voortplanting en daarnaast wordt d.m.v. KI een hybride soort gegenereerd. De onderzoeker heeft toegelicht dat ook in de natuur spontaan hybride soorten ontstaan. Op een grotere schaal zal dit bijdragen aan fundamentele wetenschappelijke biologische kennis over de werking van de evolutie.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in deze projectaanvraag zijn:
Onderzoekers: zij zullen hun wetenschappelijke kennis uitbreiden en erover publiceren, andere onderzoekers kunnen deze gegevens dan gebruiken.
Vissen: worden aangetast in hun welzijn en integriteit (de DEC heeft gediscussieerd over het prooidier in een proefopzet en geconstateerd dat het opeten onderdeel is van de proef).
Maatschappij: er zal meer kennis worden opgedaan over evolutionaire processen.
6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De projectbeschrijving is coherent en zowel in de aanvraag als in de bespreking met de onderzoeker heeft de DEC een zeer positieve indruk opgedaan van de kennis en kunde aanwezig om dit project uit te voeren. Het project heeft bovendien goede raakvlakken met eerder onderzoek van de onderzoeker en er bestaan reeds contacten met andere onderzoeksgroepen in hetzelfde onderzoeksveld.
8. Het project lijkt (ook al op basis van ervaring) goed opgezet en doordacht. De door de DEC gestelde vragen zijn zorgvuldig beantwoord en het contact met de onderzoeker, zowel schriftelijk als tijdens de vergadering, is als zeer verhelderend ervaren.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De vissen worden in huis gekweekt.
10. De DEC merkt op dat de huisvesting in dit project rijker dan standaard is, hetgeen een verfijning is van de proefopzet.
11. Het cumulatieve ongerief is onzes inziens realistisch ingeschat en geclassificeerd. Een kleine kanttekening hierbij: in de DEC is specifiek gesproken over het ongerief bij het opgegeten worden van de gup in één hap. In deze situatie is het ongerief moeilijk te bepalen, want het is niet precies bekend wat er gebeurt wanneer de gup door het roofdier ingeslikt wordt.

12. Naast proefgerelateerd ongerief is er geen sprake van aantasting van de integriteit van de dieren.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd in de aanvraag.

3 V's

14. De DEC is overtuigd dat de opzet van de experimenten niet op een andere manier uitgevoerd kan worden dan met het hele dier.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De benodigde aantallen dieren zijn ingeschat op basis van eerdere ervaringen.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De rijke huisvesting is hier een mooi voorbeeld van. Bovendien is er aandacht voor het zo kort mogelijk laten duren van de handelingen.
17. Duplicatie van onderzoek: N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er wordt gebruik gemaakt dieren van beide geslachten.
19. Er worden dieren met een passende dodingsmethode gedood in het kader van het project volgens methode in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU en dit is door de onderzoeker afdoende beargumenteerd. Een groot deel van de dieren zal worden hergebruikt.

NTS

20. De NTS is naar het oordeel van de DEC een heldere weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd in eenvoudig taalgebruik en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het gebruik van 9659 vissen met matig (2400) of licht ongerief (7259) op tegen het verkrijgen van interessante wetenschappelijke kennis over de evolutie?
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat de aanvraag een zeer duidelijke samenhang vertoont, en het doel als zeer interessant en relevant beoordeeld. De proefdieren die deels maximaal matig ongerief (voor 2400 dieren) en deels licht ongerief (voor 7259 proefdieren) zullen ondergaan, weegt de DEC als reële waarde. Daar staat echter tegenover dat het onderwerp 'evolutie' dermate relevant is dat de kennis die met dit onderzoek opgedaan kan worden en waar de wetenschap en maatschappij veel baat bij kunnen door de DEC als van grote waarde wordt gezien. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar hoe intelligentie in vissen evolueert bij 2400 dieren met matig ongerief, en 7259 dieren met licht ongerief. De DEC ziet in dit stadium geen verdere mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.
3. De centrale morele vraag kan dan ook met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
2. Onderstaande knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies: N.v.t.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Wageningen University & Research

10.2.e.en.g

Postbus 59 (Veiligheid & Milieu bij het Facilitair Bedrijf)

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD10400202010625

Bijlagen

3

Datum 20 november 2020

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e.en.g

Op 7 augustus 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The factors driving cognitive evolution: How do mental abilities evolve?" met aanvraagnummer AVD10400202010625. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 20 november 2020 tot en met 1 oktober 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 24 september 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 2 oktober 2020 en 2 november 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de staat van het onderzoeksveld, wetenschappelijke opbrengsten, haalbaarheid, 3V's, predatieproeven, het ongerief, humane eindpunten, de relevantie van de proeven en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

20 november 2020

Aanvraagnummer:

AVD10400202010625

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

20 november 2020

Aanvraagnummer:

AVD10400202010625

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Wageningen University & Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 november 2020 tot en met 1 oktober 2025, voor het project "The factors driving cognitive evolution: How do mental abilities evolve?" met aanvraagnummer AVD10400202010625, na advies van dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 7 augustus 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 13 november 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Artificial selection mimicking natural selection, zoals ontvangen op 13 november 2020;
 - 3.4.4.2 Hybridization of closely related Poeciliidae, zoals ontvangen op 13 november 2020;
 - 3.4.4.3 Common experimental procedures, zoals ontvangen op 13 november 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 13 november 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 24 september 2020
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 20 oktober 2020, 13 november 2020.

Aanvraagnummer:
AVD10400202010625

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Artificial selection mimicking natural selection			
	Andere vissen (andere Pisces) / Guppies (Poecilia reticulatie)	2.700	100,0% Licht
3.4.4.2 Hybridization of closely related Poeciliidae			
	Andere vissen (andere Pisces) / Xiphophorus maculatus	96	100,0% Licht
	Andere vissen (andere Pisces) / X. helleri	96	100,0% Licht
3.4.4.3 Common experimental procedures			
	Andere vissen (andere Pisces) / P reticulata, P. wingei & hybrids (P. reticulata x P. wingei) / Gambusia affinis, G. holbroki & hybrids (Gambusia affinis x G. holbroki) / Xiphophorus maculatus, X. helleri & hybrids (Xiphophorus maculatus & X. helleri)	3.659	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD10400202010625

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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 onvereenigbaar 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

Aanvraagnummer:
AVD10400202010625

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118, 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 19 april 2019
Onderwerp Voorstel casus cumulatief ongerief

Onze referentie

Geachte commissie,

In de vergadering van 22 februari bent u akkoord gegaan met het plan van aanpak van het NCad (nogmaals bijgevoegd als vergaderstuk CCD 19-06-02b) met betrekking tot cumulatief ongerief als antwoord op onze adviesverzoek in deze aan het NCad. Hierbij heeft u aangegeven het NCad te verzoeken bij de op te stellen werkgroepen ook NGO's te laten meepraten.

Het NCad heeft ons gevraagd de eerste casus voor deze werkgroepen aan te leveren. Bijgevoegd vindt u een concept reactie aan het NCad (CCD 19-06-02c) en een voorstel voor een casus (CCD 19-06-02d) die de CCD zou kunnen aanleveren. Deze keuze is gemaakt op basis van de volgende criteria:

- Er was twijfel over de ongeriefsclassificatie matig, vandaar een toevoeging van een beoordeling achteraf op de vergunning.
- Er zijn meerdere aanvragen met ditzelfde model waarbij de ongeriefsclassificatie matig wel aannemelijk werd geacht.
- Er is sprake van meerdere handelingen die cumulatief (mogelijk) tot ernstig ongerief zouden kunnen leiden.

Na goedkeuring zal contact opgenomen worden met de betreffende vergunninghouder en zal met hen worden afgestemd of/hoe zij betrokken willen zijn en of de casus geanonimiseerd moet worden. Vervolgens worden de brief met de reactie van de CCD en de casus aangeboden aan het NCad.

Het bestuur wordt gevraagd een besluit te nemen over de aan te leveren casus aan het NCad.

Bij akkoord van de casus en de brief zal de brief tezamen met de geanonimiseerde casus aan het NCad worden toegezonden.

Plan van aanpak **Cumulatief ongerief** (vs4 20 dec 2018)

1. Vraagstelling

Vraag CCD

De wet geeft onvoldoende duiding hoe kan worden vastgesteld in welke mate verschillende handelingen die elk ongerief (pijn, lijden, angst of blijvende schade) teweeg brengen tezamen het welzijn van het dier aantasten (cumulatief ongerief).

Daar meer grip op krijgen is niet eenvoudig. De guidance documenten van de EU en de casusbeschrijvingen van de FELASA, die beide opgesteld zijn om ondersteuning te bieden bij het inschatten van ongerief, zijn waardevolle documenten, maar bieden onvoldoende informatie om te bepalen hoe je de cumulatie van ongerief vaststelt. Ongerief laat zich niet optellen of in een formule uitdrukken. Toch hebben onderzoekers, de CCD, DEC's en IvD's behoefte aan betere handvatten om het cumulatieve ongerief voor het dier op een navolgbare en herhaalbare wijze in te kunnen schatten, dat wil zeggen dat ook andere deskundigen tot min of meer hetzelfde oordeel zullen komen.

De wet geeft wel enige duiding voor het ongerief in geval dieren opnieuw in een dierproef gebruikt worden. Dat mag namelijk alleen als:

- o de ernst van het ongerief licht of matig was;
- o het dier volledig is hersteld;
- o de volgende dierproef moet worden ingedeeld als licht, matig of terminaal;
- o de handeling in overeenstemming is met diergeneeskundig advies, rekening houdend met de volledige levensloop van het dier.

Dit impliceert dat meermalig gering of matig ongerief zwaarder zou moeten 'tellen' dan eenmalig ongerief. Echter de wet geeft niet aan hoe dit cumulatief ongerief bepaald moet worden.

De CCD heeft informeel het NCad gevraagd handvatten te ontwikkelen om de mate van cumulatief ongerief beter en consistentier vooraf te kunnen inschatten dan nu het geval is. De CCD geeft aan dat de guidance documenten van de EU en de casusbeschrijvingen van de FELASA in dit opzicht weliswaar tekortschieten (ze stelden niet de vraag naar eventuele cumulatie van ongerief), maar dat de inzichtelijke en consistente wijze waarop de casus in deze documenten behandeld worden bruikbaar zou kunnen zijn om verdergaande casuïstiek voor cumulatief ongerief te ontwikkelen. De casusgerichte benadering levert een manier van denken en kijken op die een grotere reikwijdte heeft dan de casus zelf.

Nadere probleemverkenning

Naar aanleiding van een startnotitie is besloten eerst een nadere probleemverkenning te doen. Daartoe zijn een aantal gesprekken gevoerd met relevante partijen, te weten:

- CCD - ter verheldering van de vraagstelling
- 10.2.e.eng - deelnemers aan de FELASA werkgroep over ongerief
- 10.2.e.eng - inspecteur van de NVWA
- 10.2.e.eng - NV-DEC

Vanuit één van de leden van Eurogroup for Animals (10.2.e.eng uit Zwitserland) is een schriftelijke bijdrage gekregen. Daarnaast is de FELASA workshop tijdens de IvD-dag (19 juni 2018) bijgewoond.

De belangrijkste uitkomsten van de probleemverkenning zijn:

- Dat er behoefte is aan meer harmonisatie van de classificatie van het ongerief vooraf. Meerdere partijen noemen casuïstiek op basis van reële cases een goede route om daar toe te komen.
- Dat bovenstaande een andere vraag is dan de oorspronkelijke vraag van de CCD, nl de vraag naar een handreiking voor cumulatief ongerief.

- Dat de EU-Richtlijn en de FELASA-werkgroep zeggen dat bij de beoordeling vooraf het ongerief van een dierproef het hoogste ongerief het ongerief is dat door enige handeling een enkel dier uit de dierproef wordt aangedaan als gevolg van de handeling. Niets weerhoudt Nederland ervan om meervoudig matig ongerief dat neigt naar ernstig te classificeren als ernstig. Vraag is wel of dit tot een CoP of een handreiking zou moeten leiden.

Daarnaast kwam uit de gesprekken naar voren dat:

- Voor concrete proeven, het bepalen van verfijningsmogelijkheden en humane eindpunten de scoringsheet van FELASA een aanrader is.
- Het van belang is dat er een culture of care in de instelling is en onderhouden wordt.

Conclusie

Er is behoefte aan casuïstiek, met daarbij bijzondere aandacht voor de cumulatie van ongerief. Dit betekent dat niet volstaan kan worden met een eenmalig advies.

2. Betrokken NCad-leden

10.2 e. on g

10.2 e. on g ondersteunt vanuit OBDA

3. Type product

Het advies zal niet leiden tot een eenduidig afwegingskader, maar wel tot een handreiking om tot een betere oordeelsvorming te kunnen komen.

Het product zal tweeledig zijn:

- Een zienswijze waarin het begrip cumulatief nader geduid wordt en waarin de factoren die mede bepalen of en hoe handelingen doorwerken in het cumulatief ongerief worden beschreven. Ook de context en doelstelling van de casuïstiek worden hierin beschreven.
- Aanvullend hierop wordt een bundel casus samengesteld. Geordend naar type onderzoek, type model, mate van ongerief, etc. Een format voor informatie die per casus minimaal beschikbaar moet zijn kan hier deel van uit maken.

De concrete vraag van de CCD kan beantwoord worden door het behandelen van casus die de CCD aandraagt waarin cumulatief ongerief mogelijk aan de orde is.

4. Aanpak

- Werken aan de hand van casus vraagt om een vaste werkgroep, die de algemene zienswijze opstelt, de werkwijze voor de casuïstiek vaststelt en de consistentie bewaakt. Per casus of groep van casus wordt een sub-werkgroepje ingesteld van bijv. twee mensen uit de werkgroep aangevuld met enkele specifieke deskundigen. Dat houdt het voor de werkgroep behapbaar en maakt het tegelijkertijd mogelijk om parallel aan enkele casus te werken.
- De werkgroep wordt in samenspraak met het IvD-platform samengesteld. Het NCad levert de voorzitter en de ambtelijk secretaris.
- Voor de zienswijze ligt de eerste verantwoordelijkheid bij het NCad.
- Voor het uitwerken van de casus ligt het voortouw bij het IvD-platform
- De werkgroep maakt een schets voor de inhoud en opzet van het algemene deel van de zienswijze en stelt de werkwijze vast voor het casuïstiek deel. Dit wordt teruggekoppeld met het NCad en het IvD-platform.
- Suggesties voor de werkwijze voor het casuïstiek deel, nader te bepalen in de werkgroep:
 - IvD-platform, CCD en NCad kunnen suggesties doen voor de bemensing van de subwerkgroepen en eventueel deelnemen aan bijeenkomsten.
 - De NVWA neemt in de laatste ronde deel voor een check
 - Het soort product dat wordt opgeleverd en hoe er mee wordt omgegaan
 - Het NCad blijft betrokken en borgt de kwaliteit en onafhankelijkheid.

- De casus worden uitgewerkt in analogie met de werkwijze van de FELASA-werkgroep: per casus een scoresheet invullen en toelichting daarbij geven.
- Oproep aan NVWA, DEC's, IvD's en CCD om cases aan te leveren, die vragen oproepen wat betreft cumulatief ongerief en die voldoende geanonimiseerd kunnen worden of al openbaar zijn. Meerdere cases kunnen parallel worden opgepakt. Deze werkwijze kan indien gewenst op termijn ook worden toegepast op ongerief inschatting in het algemeen, waar die vragen oproept.
- Start met cases waar meervoudig matig ongerief aan de orde is dat dicht tegen ernstig ongerief aanligt. De CCD-cases die de vraag naar cumulatief ongerief oproepen kunnen hierbij een goed uitgangspunt zijn.

5. Te raadplegen bronnen en externe deskundigen

De belangrijkste bronnen zijn de deskundigen die deelnemen aan de werkgroep. Zij zullen per casus aangeven welke overige bronnen geraadpleegd worden

6. Communicatie

- a) vermelding op website NCad dat de commissie aan dit onderwerp werkt
- b) publicatie van elk advies (oa de website van NCad):
 - Nederlands en Engels
 - Nederlandstalige publiekssamenvatting
 - Engelstalige samenvatting
 Publicatie via andere media, namelijk p.m.

7. Financiën

P.m.

8. Tijdlijn

Aan de slag gaan met casuïstiek betekent dat het om een langdurig traject gaat. Voor 2019 kan wel een tijdlijn worden gemaakt, waarbij de werkgroepen die met cases aan de slag gaan dakpansgewijs werken:

Januari	Voorstel doen aan CCD en IvD-platform
Februari	Samenstellen vaste werkgroep
Feb/Mrt	<ul style="list-style-type: none"> • Uitvraag cases in het bijzonder bij de CCD • De werkgroep bepaalt werkwijze, opzet van zienswijze en onderwerpen + prioritering van de casus (na uitvraag). In de werkwijze wordt ook bepaald hoe de casus worden uitgewerkt, hoe de sub-werkgroepen samengesteld worden, hoe er per casus teruggekoppeld wordt en hoe en door wie de casus wordt vastgesteld. • De werkgroep legt werkplan voor aan NCad • Na accordering worden in 2019 2-3 casus uitgewerkt. Voor de daarop volgende jaren wordt uitgegaan van 3-4 per jaar. Er kan parallel aan casus gewerkt worden.
Juni	<ul style="list-style-type: none"> • eerste concept zienswijze. Bespreking in NCad + terugkoppeling over stand van zaken casusbeschrijvingen

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Aan
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid
Postbus 93118
2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Adviesvraag cumulatief ongerief

Uw referentie

Briefkenmerk

Bijlagen
1

Datum
Betreft Adviesvraag cumulatief ongerief

Geachte NCad-leden,

Hartelijk dank voor uw plan van aanpak met betrekking tot onze adviesvraag betreffende cumulatief ongerief. Wij hebben uw plan van aanpak in onze commissie besproken en kunnen ons vinden in uw aanpak. Aanvullend daarop zouden we u willen verzoeken om bij de samenstelling van de werkgroepen ook afgevaardigde (n) van NGO's te betrekken. Als eerste casus zouden wij u willen vragen bijgevoegde casus te bespreken in een werkgroep.

Wij blijven graag op de hoogte van de voortgang.

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,

Dr. L. Hellebrekers
Voorzitter

Bijlage - Casus voor werkgroep



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'. 10800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Utrecht University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | The effects of a dietary intervention on extra-pulmonary symptoms in COPD exacerbation models |
- 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.

The aim is to investigate the effects of the dietary intervention in COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) exacerbation models on inflammation and behaviour in order to gain more in depth insight in the gut-muscle-brain crosstalk. We want to target dietary deficiencies and metabolic disturbances, via modulation of the gut-muscle-brain crosstalk, under pulmonary and systemic inflammatory stress. The hypothesis is that the communication between gut, skeletal muscle and brain is disturbed by low grade inflammation that flares up during infectious exacerbations.

COPD exacerbations in humans have been associated with impaired regulation of muscle oxidative metabolism, depression and with cognitive decline (1, 2). We have demonstrated that a dietary intervention in a murine model for COPD, the lipopolysaccharide induced neutrophil influx in bronchoalveolar lavage fluid as well as right ventricle heart hypertrophy could be attenuated (3). In addition, components of the current dietary intervention could inhibit the development of anxiety-like behaviour in a murine model for autism (4, 5). For several nutrients there is accumulating evidence for a modulating role on cognitive performance and mood.

COPD is mainly directly related to the prevalence of tobacco smoking and, therefore, a sub-chronic (10 weeks) and chronic (6 months) cigarette smoke models will be used. In addition, the elastase-induced emphysema model (6) will be included in order to induce emphysema in the absence of cigarette smoke. At the same time, emphysema is being induced via similar molecular processes as cigarette smoke. It is

of importance to include this model since cigarette smoke contains nicotine, which is known to modulate behaviour (7). Though, other compounds in cigarette smoke may affect the brain as well. Besides, in the presence of cigarette smoke, the induced inflammatory processes in the lungs lead to lung damage or emphysema. Whereas in the elastase model, lung damage is being directly induced which then triggers inflammatory processes. In this way, we can examine the effects of this lung damage or emphysema, and the subsequent inflammatory processes, on extra-pulmonary symptoms. These differences in pathways can provide valuable insights into the pathways involved in COPD-related extra-pulmonary symptoms.

For translational purposes, the COPD models will be extended to COPD exacerbation models by the exposure to lipopolysaccharide (LPS), the major membrane component of gram-negative bacteria, or polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C), a synthetic analogue of viral double-stranded RNA. Bacterial and viral infections are major triggers for exacerbations in COPD (8). The combination of the smoke or elastase model with a trigger may augment inflammatory responses and progressed emphysematous changes.

Different behavioural test will be performed during different stages of COPD development:

- Open field test (OF): willingness to explore and locomotion
- Social interaction test (SI): social behaviour
- Marble burying (MB): exploratory and anxiety-like behaviour
- Spatial memory (SM): cognition

Other outcome parameters:

- Forelimb grip test: Muscle strength
- Lung function test: Inflammation and emphysema
- After sacrificing mice pulmonary inflammation and emphysema will be confirmed by bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and lung morphology in paraffin embedded lung tissue sections and systemic inflammation by inflammatory profile in blood. To find possible mechanistic leads for the gut-muscle-brain crosstalk, specific brain areas relevant for behavioural and cognitive deficits will be analysed on monoamine levels (serotonin, dopamine, noradrenaline and their metabolites) through HPLC. In addition neuroinflammation will be assessed by measuring microglial cell and astrocyte activity as well as inflammatory mediator profiles.

These parameters are necessary in order to examine behavioural, cognitive, motor and lung functioning before and after multiple exacerbations in COPD models. In addition, we can compare these functions between the COPD exacerbation models.

The above mentioned parameters will be supported by post-mortem analyses of the muscles, brain, lungs and microbiome.

The questions we want to answer:

- Do different COPD exacerbation models develop behavioural and cognitive deficits? (phase 1)
- Do different triggers have different effects on various outcome parameters? (phase 1)
- Does a dietary intervention modulate behaviour, muscle function and inflammation in COPD exacerbation models? (phase 2)
- Which components of the dietary intervention are most effective in modulating behaviour, muscle function and inflammation in COPD exacerbation models? (phase 3)
- Does a dietary intervention have beneficial effects on the action of regularly used COPD medication in a COPD exacerbation models? (phase 4)

1. Crul T, Testelmans D, Spruit MA, Troosters T, Gosselink R, Geeraerts I, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Gene expression profiling in vastus lateralis muscle during an acute exacerbation of COPD. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25: 491-500.
2. Federman AD, Wolf MS, Sheng T, O'Connor R, Martynenko M, Wisnivesky J. Diminished cognitive function among chronic obstructive pulmonary disease patients during periods of acute illness exacerbation. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2016; 71:279-280.

3. Verheijden KAT, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, Kraneveld AD, Folkerts G. Treatment with specific prebiotics or probiotics prevents the development of lung emphysema in a mouse model of COPD. *European journal of pharmacology* 2011; 668: 12-13.
4. de Theije CG, van den Elsen LW, Willemsen LE, Milosevic V, Korte-Bouws GA, Lopes da Silva S, Broersen LM, Korte SM, Olivier B, Garssen J, Kraneveld AD. Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent impaired social behaviour and normalize brain dopamine levels in food allergic mice. *Neuropharmacology* 2015; 90: 12-22.
5. de Theije CG, Wu J, Koelink PJ, Korte-Bouws GA, Borre Y, Kas MJ, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, Garssen J, Kraneveld AD. Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse model of food allergy. *Behavioural brain research* 2014; 261: 265-274.
6. Kobayashi S, Fujinawa R, Ota F, Kobayashi S, Angata T, Ueno M, Maeno T, Kitazume S, Yoshida K, Ishii T, Gao C, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Betsuyaku T, Kida K, Taniguchi N. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2013; 49(6): 971-977.
7. Picciotto MR. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 24(9): 493-499.
8. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2008; 359:2355-2365.

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

Intratracheal instillation

Before starting the study, a pilot experiment will be performed with surplus mice in order to investigate the most optimal instillation procedure for administration of microbial triggers. On one hand, we want the instillation procedure to be effective and on the other hand, we want the procedure to be as quickly as possible since this will benefit the welfare of the animals. Intratracheal instillation has our preference as we want to prevent that the infectious triggers are entering the gastro-intestinal tract. Though, we still want to compare this method with the oropharyngeal instillation since this method may be less stressful to the animals. Firstly, we want to compare the recovery after the procedure. Secondly, we will compare the efficacy of the procedure by injecting Evans blue and examining the distribution of the dye post-mortem.

COPD modelling

Sub-chronic cigarette smoke exposure model. The outline of the model is represented in Figure 1. 8-10 weeks old female Balb/c mice are exposed to air or cigarette smoke in a whole-body chamber while freely moving. Cigarette smoke exposure: the first week we will slowly rise the dose of smoke from day 1 to day 5, increasing the dosage each day. From week 2-10: the maximum number of cigarettes for 5 days a week. Reference cigarettes will be used for smoke exposure. During smoke exposure, the carbon monoxide (CO), temperature and oxygen (O₂) is monitored. These parameters will be adapted when deviating from optimal levels.

After 6 weeks of smoke exposure we start to evoke pulmonary inflammation by a intratracheal instillation of a bacterial endotoxin (LPS) or a viral component (poly I:C) every ten days at three timepoints. The trigger agents were administrated by intratracheal administration under short inhalation anaesthetisation.

Smoke exposure will continue during the exacerbation period until the day of sacrifice.

Chronic cigarette smoke exposure model. 8-10 weeks old female Balb/c mice are exposed to air or cigarette smoke in a whole-body chamber while freely moving. Cigarette smoke exposure: the first week we will slowly rise the dose of smoke from day 1 to day 5, increasing the dosage each day. From week 2-26: the maximum number of cigarettes for 5 days a week. Reference cigarettes will be used for smoke exposure. During smoke exposure, the carbon monoxide (CO); temperature; oxygen (O₂) is monitored. These parameters will be adapted when deviating from optimal levels.

After 22 weeks of smoke exposure, it is expected that mice have developed emphysema. Though, as this

may deviate between experiments, we want to examine whether mice have developed emphysema before the first infectious trigger. This may clarify which pathology (occurrence of emphysema or not) may lead to extra-pulmonary symptoms that are common in COPD. Therefore, we will include extra mice which we will sacrifice before the first trigger exposure, and after the first behavioural and muscle function tests, to determine whether emphysema had developed by lung histology. In the remaining group, we will start to evoke pulmonary inflammation by a intratracheal instillation of bacterial endotoxin (LPS) or viral component (poly I:C) every ten days at three timepoints (Figure 1) after 22 weeks of smoke exposure. The microbial trigger agents will be administered by intratracheal administration under short inhalation anaesthetisation.

Smoke exposure will continue during the exacerbation period until the day of sacrifice.

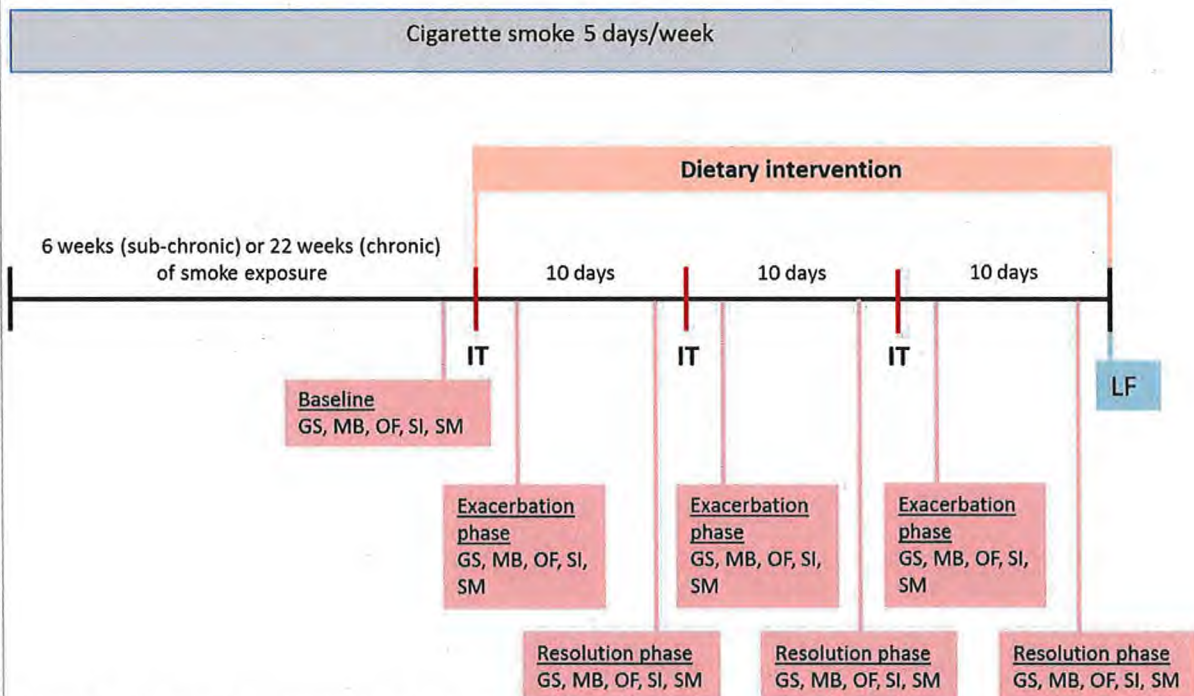


Figure 1. Timeline experimental design cigarette smoke COPD exacerbation models, including the dietary intervention (from phase 2). At baseline and at resolution phases we will carry out simple lung function measurements with the Buxco in some of the animals in order to follow basal lung function outcomes. Baseline: before induction of exacerbation; Exacerbation: days after infectious trigger instillation; Resolution phase: days before the next trigger instillation; IT: infectious trigger (LPS or poly I:C); GS: grip strength test; MB: marble burying test; OF: open field test; SI: social interaction test; SM: spatial memory test; LF: lung function.

Elastase-induced emphysema model (only phase 1 and 2). The overall design is depicted in Figure 2 and is based on work of Ceelen and colleagues (1). In order to induce emphysema, porcine pancreatic elastase will be instilled intratracheally once per week for three weeks. Three weeks after the last elastase instillation, mice will be exposed to intratracheal instillation of bacterial endotoxin (LPS) or viral component (poly I:C) every ten days at three timepoints. The microbial trigger agents will be administered by intratracheal administration under short inhalation anaesthetisation.

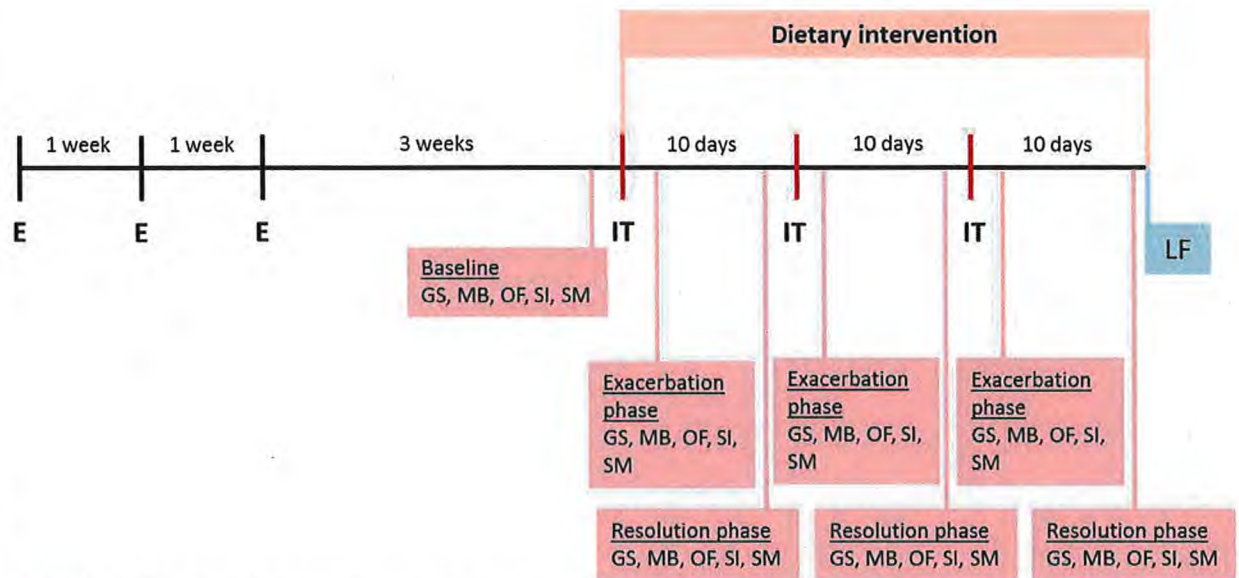


Figure 2. Timeline experimental design elastase-induced COPD exacerbation model, including the dietary intervention (only phase 2). At baseline and at resolution phases we will carry out simple lung function measurements with the Buxco in some of the animals in order to follow basal lung function outcomes. Baseline: before induction of exacerbation; Exacerbation: days after infectious trigger instillation; Resolution phase: days before the next trigger instillation; IT: infectious trigger (LPS or poly I:C); GS: grip strength test; MB: marble burying test; OF: open field test; SI: social interaction test; SM: spatial memory test; LF: lung function.

Primary outcome parameters (all phases)

The part of the experimental design starting from the first behavioural testing (just before the first trigger exposure) will be equal in all models and phases:

Primary outcome parameters will be measured at seven different time points in the COPD exacerbation model. First measurement is baseline (before first trigger), which is required to examine the impact of the infectious triggers on primary outcomes in our models. The subsequent days after the trigger are considered as the exacerbation phase and the days just before next trigger are considered as the resolution phase. We want to distinguish these phases in order to investigate the impact of both a single exacerbation and multiple exacerbations, and to what extent the animals recover from these exacerbations throughout the study. In total, there will be three trigger administrations in order to determine whether multiple exacerbations will enhance the worsening of primary outcome parameters in our models. At the end of the study, 10 days after the last trigger, lung function will be measured using EMKA lung function test, after mice will be sacrificed for post-mortem analyses.

1) Forelimb grip strength test:

In vivo muscle strength will be measured as forelimb grip-strength (2) with a calibrated grip strength tester by prompting the mouse to grip the trapeze bar with both forelimbs and pulling the mouse by the tail (as proximal to the body as possible) parallel to the orientation of the strain gauge and the trapeze bar. For mean grip strength analyses, a set included five repetitions and relative mean grip strength, i.e. the absolute mean grip strength divided by body weight (grams) will be calculated.

2) Open Field test:

The open field test (3) is a commonly used qualitative and quantitative measure of general locomotor activity and willingness to explore in rodents. This test is based on innate tendencies of avoidance of bright light and open spaces and of exploring novel environment. When placed into an open field for the first time, mice tend to remain near the walls of the apparatus. It has been shown that anxiolytics administration increases exploration time in the centre of the open field while stressful stimuli decrease the number of centre visits. Open field activity, therefore, represents a valid measure of marked changes in exploratory and "anxiety-like" behaviours. It is expected that mice, which developed emphysema,

show increased anxiety-like behaviour and decreased exploration and locomotor activity. Mice will be exposed to a 45 × 45 cm open field for 5 min.

3) Marble burying test:

This test assesses anxiolytic and exploratory behaviour of mice. It is expected that the COPD models show increased anxiety and less explorative behaviour. The cage will be filled with approximately 5-10 cm deep wood chip bedding, lightly tamped down to make a flat, even surface. A regular pattern of 20 glass marbles will be placed on the surface, evenly spaced, each about 4 cm apart. One mouse is placed in the cage and left for 30 minutes. The mouse will be undisturbed and potential sources of ultrasound will be eliminated. The number of marbles buried with bedding (to 2/3 of their depth) will be counted (4, 5).

4) Social interaction:

We expect that mice, who suffer from COPD symptoms, will show less social interaction. With dietary intervention, social interaction may be improved.

The behavioural assessment is adapted from a previous description (6, 7). Mice are placed in a 45 × 45 cm open field, with a small perforated Plexiglas cage (10 cm diameter) located against one wall allowing visual, olfactory and minimal tactile interaction. Mice are habituated to the open field for 5 min and an age- and gender-matched unfamiliar target mouse is introduced into one of the cages for an additional 5 min. By using video tracking software (EthoVision 11, Noldus), an interaction zone around the cage is digitally determined to measure time spent in the interaction zone, latency until first occurrence in the interaction zone and total distance moved.

We do not include the target mice into the total number of animals of this application since this experiment does not induce stress that is equally severe or more severe than the insertion of a needle.

5) Spatial memory test:

We expect that mice who suffer from COPD symptoms (e.g. emphysema) will show cognitive impairment (decreased performance in spatial memory). We want to (partially) reverse cognitive impairment with the dietary intervention.

In this test, the ability to react to a spatial novelty after a 3 min delay will be measured. Mice will be individually submitted to seven consecutive, 6-min sessions. During session 1 (S1), mice are placed into the empty open field. During sessions 2-4 (S2-S4), five objects will be introduced, and mice will be placed into the apparatus to allow them to habituate to the apparatus and to the objects configuration (habituation phase). During the 3-min intersession interval, the animals will be returned to a waiting cage located inside the test room. During the spatial test session (S5), the objects configuration will be changed by moving two objects (displaced objects, DO) and leaving the other three objects in the same position (non-displaced objects, NDO). After the spatial test session in both experiments, animals will be submitted to two additional sessions: 6 and 7, with an intersession interval of 3 min. In session 6, the configuration of the objects will be kept unchanged as compared to S5. In the last session (session 7), one of the familiar objects will be replaced by a new object (substituted object, SO); the other four objects will be left unchanged (non-substituted objects, NSO). In all sessions, locomotor activity will be recorded by counting the number of sector crossings. From sessions 2 to 7, object exploration will be evaluated on the basis of the mean time spent by the animal in contact with the different objects. A contact will be defined as the snout of the subject actually touching an object. Habituation to objects exploration will be assessed by averaging the duration of contacts with the five objects during sessions 2, 3, and 4 in each group. The animals' ability to selectively react to the spatial change will be analysed by calculating the spatial re-exploration index ($DO [S5] - DO [S4] = DO$ and $NDO [S5] - NDO [S4] = NDO$) (8).

6) Lung function test:

Airway function will be measured prior to sacrifices the animals at the end of the experimental setup, 10 days after the last trigger exposure. Under intraperitoneal injection anaesthesia, mice will be ventilated and inspiratory capacity will be measured.

Measuring lung function will approximately take 5-10 minutes, followed by sacrificing of mice in order to

collect all further data of interest.

Monitoring COPD symptoms (all phases)

In order to follow the progression of certain COPD symptoms, we will perform extra tests and analyses. Firstly, we will collect blood via a short puncture of the facial vein at four time points; before each microbial trigger exposure and 10 days after the last trigger exposure (at the end of the study). In this way, we can measure cytokine levels (i.e. systemic inflammation) and other biomarkers of COPD. Secondly, we will measure lung function with the Buxco Small Animal Whole Body Plethysmography at four time points; before each microbial trigger exposure and 10 days after the last trigger (at the end of the study). In this device, mice are individually placed in a plexiglas cylinder in which respiratory rates, volumes, flows and resistance are measured. These parameters are measured in conscious and unrestrained mice for approximately 5-10 minutes. Though, it has to be mentioned that the lung function test (EMKA) at the end of the experiment will be the primary outcome for lung function, since this test is a better measurement for emphysema.

Dietary intervention (from phase 2)

After phase 1, we will select the most appropriate smoke model (sub-chronic or chronic) with the most feasible exacerbation trigger (LPS or poly I:C) in comparison to the control group in order to examine the effects of the dietary intervention on behaviour and cognition, muscle atrophy, lung inflammation (cytokine profile and cellular influx), lung function and emphysema.

If outcomes in all groups will be similar, we prefer to continue experimental setup with the sub-chronic model, because this model has the advantage to be shorter and, thereby, will be of less discomfort for the animals.

To investigate the efficacy of the complete nutritional diet in COPD exacerbation models we will start dietary intervention simultaneously with the first trigger. The dietary intervention will be provided ad libitum via normal food intake (pellets). The diet will consist of the following components:

- n-3 PUFAs
- prebiotic fibres
- amino acids
- micronutrients

Our partners have a great expertise in establishing and producing nutritional concepts. A definite concept will be determined and produced by the partners, including the appropriate control diet. This control diet will be a standardized diet consisting of similar levels of other components such as carbohydrates and fat. The components of interest in the dietary intervention will be similar to those proven to be effective in previous studies.

If dietary intervention will have a significant effect on the outcomes (mainly behaviour and inflammation), we will investigate the efficacy of the different active modules in the nutritional concept (phase 3; same COPD exacerbation model as used in phase 2). Nutritional active modules will be administered daily via normal food uptake (pellets) initiating at the first administration of the infectious trigger.

We also want to include a study (phase 4) in which the dietary intervention is compared to, and combined with, regularly used COPD medication, such as anti-inflammatory drugs or psychotropic drugs (each in 2 different concentrations). These drugs alone are not always effective and have many side effects. The nutritional concept in this project may have beneficial effects on the action and safety of these drugs when exposed in combination.

The same COPD exacerbation model as the one used in phase 2 will be included. The drugs will be administered daily for five days per week (the last 30 days of COPD model; either orally, intraperitoneal injection or subcutaneous injection), starting from the first trigger, and with the initiation of the dietary intervention (ad libitum via normal food uptake; pellets).

1. Ceelen, JJ, Schols AM, van Hoof SJ, de Theije CC, Verhaegen F, & Langen RC. Differential regulation of muscle protein turnover in response to emphysema and acute pulmonary inflammation. *Respiratory*

- research 2017; 18(1): 75.
2. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol* 1979; 1: 233-236.
 3. Stanford SC. The Open Field Test: Reinventing the Wheel. *Journal of Psychopharmacology* 2007.
 4. Njunge K & Handley SL. Evaluation of marble-burying behaviour as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 1991; 38(1): 63-7.
 5. Deacon, RMJ. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols* 2006; 1(1): 122-4.
 6. de Theije CG, Wu J, Koelink PJ, Korte-Bouws GA, Borre Y, Kas MJ, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, Garsen J, Kraneveld AD. Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse model of food allergy. *Behavioural brain research* 2014; 261: 265-274
 7. Liu J et al. Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nature Neuroscience* 2012; 15(12): 1621-3.
 8. De leonius E. et al. Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology (Berl.)* 2007; 194(4): 517-25

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

Based on the variability observed in previous experiments, we will need a minimum of 15 mice per treated group (n=6 for histology; n=9 for airway function measurement) in order to generate sufficient power (1, 2). Due to ventilation during airway function measurement and lung lavage, it is not possible to use the airway function animals for morphology histology as well.

We do not have any experience with exacerbation models, but we estimate the total group sizes out of other established COPD models without exacerbation (1).

After each phase, there are selection points in order to decrease the number of groups in the upcoming phase. For example, after the first phase we will choose one infectious trigger to continue with in phase 2, which will save one group of animals. Based on the generated knowledge we will perform a power analysis using "PS Power and sample size calculation" in order to decrease the group sizes in the upcoming experiment.

The proper controls will be included in order to guarantee the quality of the model. In addition, these controls will help to support the selection points throughout the study. One-way ANOVA tests will be included in order to determine whether functional outcomes in our model(s) significantly ($p < 0,05$) deviate from the ones in control mice.

1. Abdul Roda, M. Thesis: The matrikine PGP in lung disease: a translational study 2015.
2. Ceelen, JJ, Schols AM, van Hoof SJ, de Theije CC, Verhaegen F, & Langen RC. Differential regulation of muscle protein turnover in response to emphysema and acute pulmonary inflammation. *Respiratory research* 2017; 18(1): 75.

B. The animals

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

Animal experiments will be carried out with 8-10 weeks old Balb/c female mice, obtained from a registered breeding company. The main reason for choosing female mice is that it is most likely that male mice will be aggressive toward each other, since the experiments will take ten weeks to six months. In previous experiments with male mice, we observed aggression amongst one another after a longer period of housing. Whereas in female mice, this issue was not observed at all. In order to avoid solitary housing and dropouts because of fighting, female mice will be included.

The main reason for using Balb/c mice is that we have a lot of experience with this strain for the smoke models. This strain shows higher neutrophil influx in the lungs after cigarette smoke exposure (1, 2) compared to other strains. The neutrophil influx in the airways is an important phenomenon in COPD and, therefore, Balb/c mice are preferred for this study. Changes in behaviour are important readout parameters, therefore it is important that we observe those behavioural changes. Others showed that increased anxiety in mice is observed after cigarette smoke cessation (3) and exposure (4). Though,

when no changes in behaviour are observed, we want to adjust the model by, for example, switching to another mouse strain.

Groups are listed following the respective phases, which have been described in detail (see project proposal).

Phase 1

Before carrying out phase 1, at least one and maximal two pilot experiment(s) will be performed in order to optimize our COPD exacerbation models. For example, since this will be the first time that these COPD models are combined with three infectious triggers, there is a chance that we have to adjust the trigger dosage. The pilot experiment might therefore have to be carried out a second time. However, it is also possible that we do not have to carry out the pilot experiment a second time or only for one of the models.

Cigarette smoke exposure models (sub-chronic and chronic)

- Control: air + vehicle
- COPD model: smoke + vehicle
- COPD exacerbation model 1 (bacterial trigger): smoke + LPS
- COPD exacerbation model 2 (viral trigger): smoke + Poly I:C

Elastase induced emphysema model

- Control: vehicle + vehicle
- COPD model: elastase + vehicle
- COPD exacerbation model 1 (bacterial trigger): elastase + LPS
- COPD exacerbation model 2 (viral trigger): elastase + Poly I:C

We know that minimal 9 mice are required in the EMKA lung function test due to variability. In addition, we need at least 6 mice for histology. We do not expect that we have any dropouts in our control groups.

Sub-chronic smoke model: The expected dropout rate in this model will be about 6%, which leads to a group size of $15+1=16$ mice. In total, we need $15+16+16+16=63$ mice for the sub-chronic smoke model.

Chronic smoke model: Based on our previous work (1), we expect to have a dropout rate of 25% in this model. This leads to a group size of $15+5=20$ mice. Since we want to examine whether mice in this group have developed emphysema before the first trigger exposure, we will include $2*6$ mice for histology analyses solely in phase 1; one group of air exposed mice and one group of cigarette smoke exposed mice. In total, we need $15+20+20+20+12=87$ mice for the chronic smoke model.

Elastase model: The expected dropout rate in the elastase model will be 15% (5). This leads to a group size of $15+3=18$ mice. In total, we need $15+18+18+18=69$ mice for the elastase model.

For the pilot experiments, we will need maximal $2*(63+87+69)=438$ mice.

For the final experiment of phase 1, we need $63+87+69=219$ mice.

Phase 2

Smoke model (sub-chronic/chronic) and elastase model

- Control: Air/vehicle + vehicle + control diet (=control group)
- COPD model: COPD model + vehicle + control diet
- COPD exacerbation model: COPD model + microbial trigger + control diet
- Dietary intervention: COPD model + microbial trigger+ nutritional concept

Since we measure the same parameters as in phase 1, we need at least $9+6=15$ mice per group. We do

not expect to have dropouts in the control group. We want to include both one of the smoke models (sub-chronic or chronic) and the elastase model in this phase. For the smoke model, we need either $15+16+16+16=63$ (sub-chronic) or $15+20+20+20=75$ (chronic) mice, and for the elastase we need $15+18+18+18=69$ mice.

In total, we need either $63+69=132$ or $75+69=144$ mice for phase 2.

It is possible that our dietary concept will not elicit the desired effects (improvements in cognition and behaviour). In this case, we will carry out phase 3 in order to investigate which dietary components are most, and least, effective. Based on our findings in phase 3, we will modify the total concept and carry out phase 2 again with this optimized dietary intervention. Only one COPD exacerbation model will be included in re-examining the efficacy of the dietary concept.

When we will carry out phase 2 for a second time, we will need maximal 75 mice.

Phase 3

Different active modules in the nutritional concept.

- Control: Air/vehicle + vehicle + control diet
- COPD exacerbation model: COPD model + microbial trigger + control diet
- Complete dietary intervention: COPD model + microbial trigger + nutritional concept
- Module 1: COPD model + microbial trigger + prebiotic fibres
- Module 2: COPD model + microbial trigger + n-3 LCPUFAs
- Module 3: COPD model + microbial trigger + amino acids
- Module 4: COPD model + microbial trigger + micronutrients

Again, we need at least $9+6=15$ mice per group for the lung function test and histology. Since we do not expect dropout in the control group, we will need 15 mice for this group. The expected dropout rate is similar in the remaining groups. The specific COPD exacerbation model will depend on findings in phase 1 and 2. However, the aim is to continue with the smoke model from phase 3.

In total, we need either $15+(6*16)=111$ or $15+(6*20)=135$ mice for phase 3.

Phase 4

Dietary intervention combined with regularly use COPD medication.

- Control: Air/vehicle + vehicle + control diet
- COPD exacerbation model: COPD model + microbial trigger + control diet
- Dietary intervention: COPD model + microbial trigger + nutritional concept
- Psychotropic drug concentration 1: COPD model + microbial trigger + control diet + drug
- Psychotropic drug concentration 2: COPD model + microbial trigger + control diet + drug
- Anti-inflammatory drug concentration 1: COPD model + microbial trigger + control diet + drug
- Anti-inflammatory drug concentration 2: COPD model + microbial trigger + control diet + drug
- Combination 1: COPD model + microbial trigger + nutritional concept + anti-inflammatory drug (conc 1)
- Combination 2: COPD model + microbial trigger + nutritional concept + anti-inflammatory drug (conc 2)
- Combination 3: COPD model + microbial trigger + nutritional concept + psychotropic drug (conc 1)
- Combination 4: COPD model + microbial trigger + nutritional concept + psychotropic drug (conc 2)

The minimum number of mice per group has to be 15 ($9+6$), which is the necessary group size for the control mice. For the other groups, we expect that the dropout rate will be similar. The aim is to use either the sub-chronic or chronic smoke model (depending on our findings in phase 1 and 2) in this phase.

In total, we need either $15+(10*16)=175$ or $15+(10*20)=215$ mice in phase 4.

All phases

For the intratracheal instillation pilot experiments, we want to test multiple instillation procedures. The appropriate technique will be selected based on the applicability (can it be carried out easily, quickly and safe?) and the efficacy (is the substance spread throughout the lungs without any spill in the gastrointestinal tract?). For testing the different instillation procedures in a pilot experiment we need 20 surplus mice.

For training purposes, we need maximal 30 surplus mice. We want to perform the training in live mice. This is necessary to confirm that the procedure was successful by examining the spreading of the fluid in the lungs post-mortem. Thus, mice will recover shortly after the procedure after which these mice will be sacrificed for post-mortem confirmation of the researcher's execution of the technique. Since we have to train at least three people in these procedures, we will need maximal 30 mice for this procedure.

In total, we need for all phases:

maximal $50+438+219+144+135+75+215=1276$ mice

When we will continue with the sub-chronic smoke model instead of the chronic and carry out the pilot experiment and phase 2 only once, the number of animals necessary for this project will be approximately 29% lower.

1. Thesis: The matrikine PGP in lung disease: a translational study. M. Abdul Roda, 2015.
2. Morris A, Kinnear G, Wan WY, Wyss D, Bahra P and Stevenson CS. Comparison of cigarette smoke induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses. J.Pharmacol.Exp.Ther. 327:3:851-862, 2008.
3. Stoker AK, Semenova S, Markou. Affective and somatic aspects of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in C57BL/6J and BalB/cByJ mice. Neuropharmacology 54, 1223-1232, 2008.
4. Ponzoni L, Moretti M, Sala M, Fasoli F, Mucchietto V, Lucini V, et al. Different physiological and behavioural effects of e-cigarette vapour and cigarette smoke in mice. European Neuropsychopharmacology 2015; 25(10): 1775-1786.
5. Ceelen, JJ, Schols AM, van Hoof SJ, de Theije CC, Verhaegen F, & Langen RC. Differential regulation of muscle protein turnover in response to emphysema and acute pulmonary inflammation. Respiratory research 2017; 18(1): 75.

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

Unfortunately, replacement is not possible in this study. COPD is the result of complex processes in the lungs. In order to model COPD, it therefore requires the interaction between the lungs, smoke and the immune system. In addition, the efficacy of the dietary intervention has to be examined in an intact animal, because the action of the diet requires an intact digestive tract. However, we will test the effects of cigarette smoke and the dietary components in vitro as well by developing a lung organoid in culture, which will mimic the lung tissue.

Reduction

Within our departments, we have experience with both the COPD mouse models and the techniques that will be applied in this study. The likelihood of dropouts will be reduced by this experience. We already have experience with COPD models, but we never extended these models to COPD exacerbation models. After measuring and analysing the COPD exacerbation models, we will use "PS Power and sample size calculation" in order to decrease group sizes in the upcoming experiments. Furthermore, based on our findings in the first phase, we will eventually select only one smoke model and one infectious trigger which we will include in the dietary intervention study. This will reduce the required number of groups.

Refinement

Only experienced personnel will carry out the intratracheal instillations. The use of mice for COPD modelling has been generally accepted in the literature. Several techniques to measure immune and respiratory parameters in mice have been initialized and optimized within our department. In addition, surplus mice will be used for training purposes, which will help to reduce the chance of dropouts.

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

During the experiments, clinical signs will be observed on the experimental days, in order to detect deviant behaviour. We will observe bodyweight, condition, posture and behaviour in order to identify any severe discomfort in the animals.

Measures will be taken to ensure that mice are properly anaesthetised during intratracheal instillations. Intratracheal instillation will be carried out under short inhalation sedation. Inhaled sedation has many benefits as it gives less stress to the animals and these animals will recover more quickly as opposed to injection sedation.

During smoke exposure, the exposed air will be continuously monitored for carbon monoxide levels (approximately 200-400 parts per million).

To optimize wellbeing of the animals, housing will be performed in groups in an enriched environment. Besides, only trained and experienced personnel will carry out the intratracheal instillations, which will prevent unnecessary discomfort caused by errors.

When animals show severe discomfort they will be euthanized.

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.

The dietary intervention has been developed recently and will be tested for the first time in this study. In addition, we are the first to include the occurrence of multiple exacerbations in several models of COPD, and to examine behaviour in COPD exacerbation models.

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.

Intratracheal instillation: the appropriate anaesthesia will be used to reduce the stress experienced by the mice during this procedure as much as possible.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Dyspnoea and loss of muscle strength may occur as a result from the model (e.g. smoke and elastase exposure). Dyspnoea and decreased muscle strength are common in COPD patients as well. Immediately after smoking, mice will experience dizziness and the fur may appear messy (less than 1 hour). In addition, mice will experience some stress from both the smoke exposure procedure and the anaesthetisation.

Explain why these effects may emerge.

Both smoke exposure and instillation with elastase lead to widespread lung damage and inflammation, thereby increasing the respiratory rate comparable to the human situation in COPD. These effects are most likely aggravated after every infectious trigger exposure. Stress may result from handling and exposure to anaesthesia.

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

Treatment and behavioural tests are carried out by experienced researchers. Exposure to smoke is continuously monitored (approx. 200-500 ppm; oxygen >20%). Monitoring body weight of the animals by weighing them every day for five days in the week during the first two weeks of the experiment and during trigger exposure. Mice will be weighed once per week after the first two weeks until first trigger exposure unless there are indications for additional discomfort in (one of) the animals (e.g. extra weight loss and pilo erection not directly related to smoke exposure). In these cases, we will monitor body weight every day for five days a week until the situation has normalized. Frequent and strict monitoring will be used to prevent that the animals have to suffer from severe discomfort.

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.

When animals lose more than 15% of their weight within a period of two days and when there is sustained pilo erection together with depressed mobility and breathing problems.

We will observe mice daily and when an animal is experiencing a situation as described above, we will take action swiftly by sacrificing the animal.

Our aim is to prevent that the level of discomfort will exceed the moderate scale and that as little animals as possible will experience a level of discomfort that will be more severe than moderate. We will achieve this by frequent and strict monitoring.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is based on previous research (1, 2), which is a cumulative of both the dropout rates and the expected occurrence of humane endpoints.

Sub-chronic smoke exposure model: 6%

Chronic smoke exposure model: 25%

Elastase-induced emphysema model: 15%

When continuing with the sub-chronic smoke model, the weighed incidence will be:

$$((412*6)+(128*15)+(87*25))/627=10.5\%$$

When continuing with the chronic smoke model, the weighed incidence will be:

$$((63*6)+(128*15)+(581*25))/772=21.8\%$$

1. Abdul Roda, M. Thesis: The matrikine PGP in lung disease: a translational study 2015.

2. Ceelen, JJ, Schols AM, van Hoof SJ, de Theije CC, Verhaegen F, & Langen RC. Differential regulation of muscle protein turnover in response to emphysema and acute pulmonary inflammation. Respiratory research 2017; 18(1): 75.

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').

Smoke exposure: Moderate

Elastase instillation: Moderate

Behavioural, motor and lung function tests: Moderate

Exposure to infectious triggers: Moderate

Pilot study and training intratracheal instillation: Moderate

The accumulative discomfort in this project can be scaled as **moderate**.

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.

Post-mortem research and organ isolation. Essential measurements can be carried out with the animal material in order to support our findings in behavioural, motor and lung function tests, and to reveal underlying mechanisms in COPD exacerbations.

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

Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of 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.zbo-ccd.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'. | 40100 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Wageningen Research |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input checked="" type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
<input checked="" type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training
<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
<input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures |
|-----|---|---|

3 General description of the project

3.1 Background

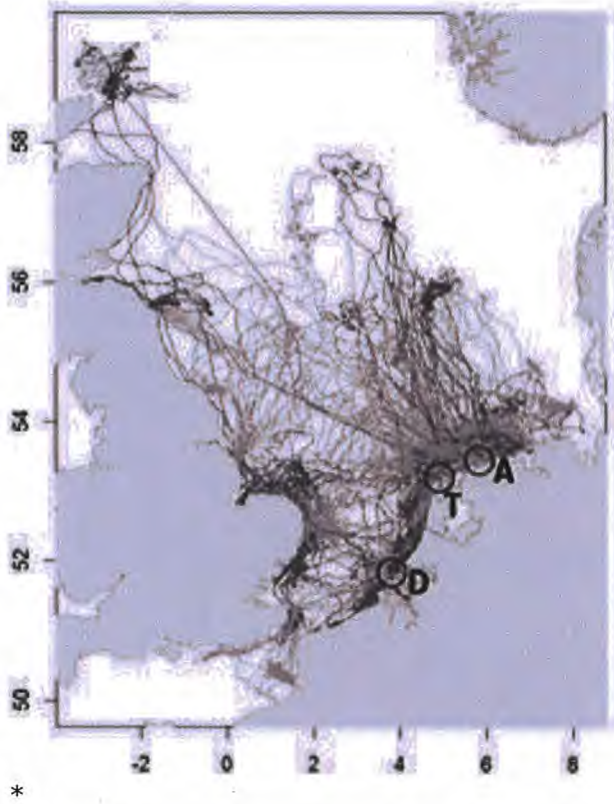
Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- 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.

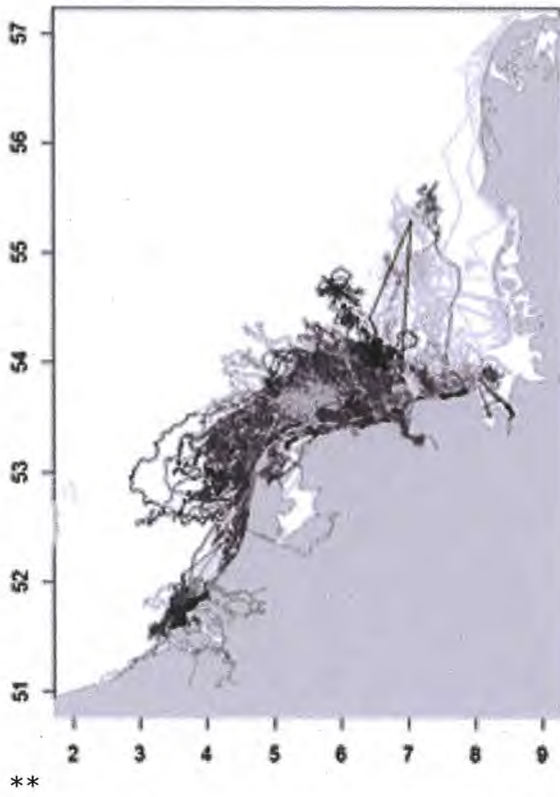
Zowel de grijze als de gewone zeehonden (*Phoca vitulina* en *Halichoerus grypus*) zijn in Europa beschermd onder de habitat richtlijn (appendix II en IV) daarnaast vallen de gewone zeehonden onder de conventie van Bonn voor migrerende soorten (Convention of Migratory species). Daarom dienen zeehonden specifiek gemonitord en beschermd te worden.

Het zeehondenteam van ons instituut is al sinds 1960 verantwoordelijk in Nederland voor de beleidsadvisering, de monitoring en het onderzoek van alle aspecten van zeehonden, waarbij ze ook veel internationaal samenwerken. Belangrijk daarin is de continue monitoring van de populatie m.b.v. vliegtuig tellingen (1960-nu) waarbij populatie trends en pup-productie nauwkeurig gevolgd kunnen worden.

Naast de monitoring, onderzoek en adviezen in opdracht van het rijk (m.n. ministeries van RWS en LNV), wordt ook in opdracht van ondernemingen onderzoek gedaan naar effecten van specifieke activiteiten zoals de bouw en gebruik van windparken, havens, en visactiviteiten, maar ook bijvoorbeeld veranderingen in toeristisch gebruik. In het kader van deze projecten zijn in de afgelopen decennia bijna jaarlijks zeehonden gezenderd door het team waarbij zichtbaar is gemaakt hoe de zeehonden in Nederland afhankelijk zijn van de Noordzee (fig.1). Tevens is een eerste begrip verkregen hoe de specifieke menselijke activiteiten mogelijk de zeehonden beïnvloeden (bijvoorbeeld: Aarts *et al.* 2018, Brasseur *et al.* 2018a, Sertlek *et al.* 2016, Russell *et al.* 2014, Cremer *et al.* 2012, Brasseur & Reijnders 2001). De verwachting is dat in de komende jaren menselijke activiteiten op zee exponentieel zullen toenemen, en het ontbreekt vooralsnog aan voldoende kennis om de effecten van deze bouwprojecten en nieuwe vaarroutes op de gehele populatie te voorspellen. Negatieve effecten op de populatie moeten immers worden voorkomen. Hiervoor is echter begrip van mogelijke mechanismen nodig waarvoor fundamentele kennis over de ecologie en gedrag van de zeehonden op zee en ook de gezondheidstoestand onontbeerlijk. Zeehonden brengen het merendeel van hun tijd op zee. Omdat ze regelmatig aan land komen (om te rusten, maar ook om jongen te baren en te zogen en tijdens de verharing) kunnen populatieschommelingen bepaald worden aan de hand van tellingen van dieren aan land. Om te begrijpen wat deze schommelingen veroorzaakt is het echter ook noodzakelijk deze dieren op zee te volgen, en waarnemingen te doen aan de fysiologie van de dieren. Zo kan alleen door dieren te zenderen informatie verzameld worden over hoe de dieren foerageren of bewegen en hoe menselijk aanwezigheid dit kan beïnvloeden. Evenzo kan alleen door bijvoorbeeld bloed en spek monsters te nemen en door lengte-gewicht relaties van individuen te bepalen, vastgesteld worden wat de gezondheidstoestand is van in het wild levende zeehonden.



*



**



Figuur1. Verspreiding van gezenderde grijze zeehonden (links; letters in de figuur geven aan waar de dieren zijn gezenderd: Ameland, Texel en Deltagebied), gewone zeehonden (midden), menselijke activiteiten (rechts) in de Nederlandse kustgebieden (data: zeehonden: WMR; gebruikkaart: Min. I&M)

In de Nederlandse wateren komen meerdere soorten zeehonden voor. Onderscheid kan gemaakt worden tussen lokale populaties (gewone en grijze zeehonden) en soorten die bijvoorbeeld uit (sub)arctische gebieden in Nederland terechtkomen. Bij dit laatste horen de ringelrobben, klapmutsen, zadelrobben, baardrobben en walrussen (*Pusa hispida*, *Cystophora cristata*, *Pagophilus groenlandicus*, *Erignatus barbatus* en *Odobenus rosmarus*). Ons onderzoek richt zich vooral op de lokale populaties. De aantallen gewone zeehonden (geteld op de zandplaten) zijn relatief recent hersteld, grijze zeehonden zijn terug van een eeuwenlange afwezigheid. Waarschijnlijk is dit herstel het gevolg van de beëindiging van de jacht in de jaren '60 van de 20ste eeuw (Brasseur *et al.* 2018b, Brasseur *et al.* 2015b). Ook worden vervuilende stoffen nu zoveel mogelijk uit het milieu geweerd en zijn er beschermde zones voor zeehonden ligplaatsen ingesteld. Echter, recente tellingen laten zien dat de populatie groei stagneert, terwijl er geen aanwijzingen zijn voor emigratie of verslechterde gezondheid. Zowel in de Waddenzee als in het Deltagebied zijn een aantal zandplaten aangewezen ter bescherming van de dieren voor verstoring, vooral in de zomer wanneer de gewone zeehond jongt en ruit. Echter, in open zee waar de dieren slecht waarneembaar zijn, is bescherming moeilijker, mogelijk zijn ontwikkelingen daar debet aan de recente populatieveranderingen.

Vooral in de afgelopen decennium heeft het menselijk gebruik van de zee in het algemeen, en de kustgebieden in het bijzonder een grote vlucht genomen. Parallel hieraan is de groei van de populatie gewone zeehonden in de Waddenzee vertraagd en zelfs gestopt. Sleutelvraag is of activiteiten als bijvoorbeeld scheepvaart, het mijnen van zand, gasextractie, visserij, aquacultuur, en de productie van energie (m.n. wind) of juist natuurlijke veranderingen in bijvoorbeeld prooiaanbod, deze afname in populatiegroei beïnvloed. De Noordzee, en vooral in de dichtbevolkte gebieden zoals langs de Nederlandse kusten zullen in toenemende mate geclaimd worden voor menselijke ontwikkeling. Sleutel in het begeleiden van deze processen zodat zeehonden behouden blijven, is een goed begrip van de fundamentele eisen van de dieren en hoe deze door natuurlijke en menselijke factoren gestuurd worden. Daarnaast lijken de fundamentele inzichten die in Nederland over zeehonden verkregen worden, een goede aanvulling te zijn voor de ontbrekende inzichten bij relatieve onbereikbare zeehondensoorten in bijvoorbeeld de arctische gebieden.

literatuur:

- Aarts, G., S. Brasseur and R. Kirkwood. 2018. Behavioural response of grey seals to pile-driving. C006/18 Wageningen Marine Research. 54 pp.
- Brasseur, S., R. Kirkwood and G. Aarts. 2018a. Seal monitoring and evaluation for the Gemini offshore windfarm: Tconstruction - 2015 report. Wageningen Marine Research report ; C004/18. Wageningen Marine Research, Yerseke.
- Brasseur, S. M. J. M., P. J. H. Reijnders, J. Cremer, E. Meesters, R. Kirkwood, L. F. Jensen, A. Jeß, A. Galatius, J. Teilmann and G. Aarts. 2018b. Echoes from the past: Regional variations in recovery within a harbour seal population. PLoS ONE 13:e0189674.
- Brasseur, S. M. J. M., T. D. Van Polanen Petel, T. Gerrodette, E. H. W. G. Meesters, P. J. H. Reijnders and G. Aarts. 2015b. Rapid recovery of Dutch grey seal colonies fueled by immigration. Marine Mammal Science 31:405-426.
- Brasseur, S. M. J. M. and P. J. H. Reijnders. 2001. Zeehonden in de Oosterschelde, fase 2; effecten van extra doorvaart door de Oliegeul. Alterra. pp.
- Cremer, J. S. M., S. M. J. M. Brasseur and H. W. G. Meesters. 2012. MZI's en zeehonden in de Waddenzee: een eerste aanzet tot een analyse. IMARES. 30 pp.
- Russell, D. J. F., S. M. J. M. Brasseur, D. Thompson, G. D. Hastie, V. M. Janik, G. Aarts, B. T. McClintock, J. Matthiopoulos, S. E. W. Moss and B. McConnell. 2014. Marine mammals trace anthropogenic structures at sea. Current Biology 24:R638-R639.
- Sertlek, H. Ö., G. Aarts, S. Brasseur, H. Slabbekoorn, C. Ten Cate, A. Von Benda-Beckmann and M. Ainslie. 2016. Mapping Underwater Sound in the Dutch Part of the North Sea. Pages 1001-1006 in A. N. Popper and A. Hawkins eds. The Effects of Noise on Aquatic Life II. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York.

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?

Het hoofddoel van dit project is het verkrijgen en uitbreiden van inzicht in de ecologie en gedrag van zeehonden, in de Nederlandse wateren.

Hiermee kunnen zowel fundamentele vragen over de zeehonden worden beantwoord over bijvoorbeeld foerageerstrategieën, ontogenie van het gedrag, overleving, plaats-trouwheid en competitie, als toegepaste vragen zoals het effect van menselijk gebruik op de bewegingen, foerageersucces, overleving en uiteindelijk populatie ontwikkeling. Om specifieke vragen te beantwoorden kunnen de gegevens uit dit project worden gekoppeld aan de gegevens uit de populatie monitoring en gegevens over omgevingsfactoren (bijv. bathymetrie, bestandsopnames van vis, opwarming van zeewater of menselijke activiteiten: vaarroutes, hei-activiteiten etc.). Zowel de fundamentele kennis als de toegepaste kennis verzameld in Nederland kunnen worden gebruikt als model voor zeezoogdieren in gebieden die minder goed toegankelijk zijn waardoor minder gegevens beschikbaar zijn, bijvoorbeeld de arctische wateren.

Door bij elke onderzoek (sinds 1997) dezelfde methodiek toe te passen ontstaat er een unieke data set van gegevens over het gedrag op zee van de zeehonden verspreid zowel in de ruimte als in de tijd, waaruit ook grotere inzichten verkregen kunnen worden (Aarts et al. 2019, Brasseur et al. 2018b, Aarts et al. 2018, Brasseur 2017).

Fundamentele sub-vragen zijn:

- Is er sprake van directe of indirecte inter- of intraspecifieke competitie om ruimte of voedsel bij zeehonden (bijv. tussen de twee zeehondensoorten)?
- Hoe ontwikkelt het ruimtegebruik bij jonge dieren?

- Is er sprake van plaats trouwheid voor foerageergebieden of wordt de foerageer plek alleen gestuurd door omgevingsfactoren?
- Wat is de relatie tussen de ligplaats en het foerageergebied van de dieren?
- Hebben verschillende foerageerstrategieën invloed op de overleving van de dieren?

Toegepaste sub-vragen zijn:

- Wat zijn de effecten van de bouw van o.a. windparken op zee voor de zeehonden?
 - Wat zijn de gevolgen voor het individueel gedrag en overleving
 - Wat is het gevolg voor de populatie?
- Beïnvloeden de activiteiten op zee zoals de scheepvaart of visserij de verdeling van zeehonden op zee?
- Welke beheers- of mitigerende maatregelen kunnen worden genomen om effecten van menselijk gebruik op de zeehonden populatie te minimaliseren?
- Hoe kan men rekening houden met de cumulatie van effecten op zeehonden

Het zeehondenteam heeft lange (30 jr) ervaring in de studies naar effecten op zeehonden waarbij zij de specialisten zijn in het zenderen en bemonsteren van zeehonden in het veld en de analyse van data. Juist de vergelijking van gegevens verkregen uit meerdere studies over langere tijd zal de identificatie van effecten en het onderzoeken van mogelijke sturende mechanismen mogelijk maken, en de bescherming van de dieren optimaliseren (Aarts et al. 2019, Brasseur et al. 2018b, Brasseur et al. 2018a, Aarts et al. 2018, Roquet 2017, Sertlek et al. 2016, Aarts et al. 2016, Russell et al. 2014, Aarts et al. 2013, Cremer et al. 2012, Scheidat et al. 2009, Brasseur & Reijnders 2001).

Literatuur:

Aarts, G., S. Brasseur, J. J. Poos, J. Schop, R. Kirkwood, T. V. Kooten, E. Mul, P. Reijnders, A. D. Rijnsdorp and I. Tulp. 2019. Top-down pressure on a coastal ecosystem by harbor seals. *Ecosphere* 10 (2019) 1. 2019.

Aarts, G., S. Brasseur and R. Kirkwood. 2018. Behavioural response of grey seals to pile-driving. C006/18 Wageningen Marine Research. 54 pp.

Aarts, G., J. Cremer, R. Kirkwood, J. T. V. D. Wal, J. Matthiopoulos and S. Brasseur. 2016. Spatial distribution and habitat preference of harbour seals (*Phoca vitulina*) in the Dutch North Sea. Wageningen Marine Research rapport, 1566-7197 ; C118/16. Wageningen Marine Research, Den Helder :.

Aarts, G., J. Fieberg, S. Brasseur and J. Matthiopoulos. 2013. Quantifying the effect of habitat availability on species distributions. *Journal of Animal Ecology* 82:1135-1145.

Brasseur, S., R. Kirkwood and G. Aarts. 2018a. Seal monitoring and evaluation for the Gemini offshore windfarm: Tconstruction - 2015 report. Wageningen Marine Research report ; C004/18. Wageningen Marine Research, Yerseke.

Brasseur, S. M. J. M., P. J. H. Reijnders, J. Cremer, E. Meesters, R. Kirkwood, L. F. Jensen, A. Jeß, A. Galatius, J. Teilmann and G. Aarts. 2018b. Echoes from the past: Regional variations in recovery within a harbour seal population. *PLoS ONE* 13:e0189674.

Brasseur, S. M. J. M. 2017. Seals in motion. Wageningen University, Wageningen.

Cremer, J. S. M., S. M. J. M. Brasseur and H. W. G. Meesters. 2012. MZI's en zeehonden in de Waddenzee: een eerste aanzet tot een analyse. IMARES. 30 pp.

Roquet, F., Boehme, L., Bester, M. N., Bornemann, H., Brasseur, S., Charrassin, J. B., Costa, D., Fedak, M. A., Guinet, C., Hall, A., Harcourt, R., Hindell, M. A., Kovacs, K. M., Lea, M. A., Lovell, P., Lowther, A., Lyderson, C., McMahon, C., Picard, B., Reverdin, G. And Vincent, C. 2017. In-situ observations using tagged animals. ALPS - Autonomous and Lagrangian Platforms and Sensors, Scripps Seaside Forum La Jolla, CA, USA, 21 February 2017 - 24 February 2017. URL:<https://alps-ocean.us/white-papers/>.

Russell, D. J. F., S. M. J. M. Brasseur, D. Thompson, G. D. Hastie, V. M. Janik, G. Aarts, B. T. McClintock, J. Matthiopoulos, S. E. W. Moss and B. McConnell. 2014. Marine mammals trace anthropogenic structures at sea. *Current Biology* 24:R638-R639.

Scheidat, M., G. Aarts, A. Bakker, S. Brasseur, J. Carstensen, P. V. Leeuwen, M. Leopold, T. V. Polanen Petel, P. Reijnders and J. Teilmann. 2009. Assessment of the Effects of the Offshore Wind Farm Egmond aan Zee (OWEZ) for Harbour Porpoise (comparison T0 and T1). IMARES Wageningen UR. pp.

Sertlek, H. Ö., G. Aarts, S. Brasseur, H. Slabbekoorn, C. Ten Cate, A. Von Benda-Beckmann and M. Ainslie. 2016. Mapping Underwater Sound in the Dutch Part of the North Sea. Pages 1001-1006 in A.

3.3 Relevance

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

Het wetenschappelijk doel van het project is het verkrijgen van inzicht in de ecologie en gedrag van zeehonden. Door de unieke lange termijn gegevens over populatie veranderingen van zeehonden in Nederland kan de link met de kennis over hun gedrag op zee, relatie met omgevingsfactoren, prooi-predator relatie een substantiële bijdrage leveren tot inzichten in de ecologie van zeehonden, ook op mondiaal niveau. Hiertoe wordt ook intensief internationaal samengewerkt. Omdat zeehond in Nederland relatief goed is onderzocht, zijn dit ideaal soorten om ook in het algemeen inzicht te krijgen in de ecologie en gedrag van ook minder goed onderzochte zeehonden soorten en wellicht ook in de andere zeezoogdieren of marine toppredatoren.

In Nederland geldt de zeehond als nationale troeteldier waardoor ze buitengemeen veel aandacht krijgt in de media. Wetenschappelijke kennis draagt inhoudelijk bij tot de maatschappelijke discussie. Belangrijker echter is dat zowel de grijze als de gewone zeehonden in Europa beschermd zijn onder de habitat richtlijn (appendix II en IV) en gewone zeehonden onder de conventie van Bonn voor migrerende soorten vallen. Deze soorten vallen daarmee onder de soorten die specifiek gemonitord en beschermd dienen te worden. Gestuwd door de energietransitie, de noodzaak nieuwe eiwitbronnen te vinden en commercieel gewin, worden er op grote schaal plannen gemaakt om de zeeën verder te ontginnen voor menselijk gebruik. Eerder onderzoek heeft laten zien dat daarmee de habitat van de zeehonden mogelijk onder druk komt te staan. Om deze processen te begeleiden en effecten op de zeeën eventueel te mitigeren zal fundamentele begrip van de ecologie van de zeehonden, hun bewegingen en gedrag op zee maar ook de gezondheidstoestand onontbeerlijk zijn. De resultaten in dit project dragen hiertoe bij.

3.4 Research Strategy

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

Om de ecologie van de zeehonden te doorgronden moet veel verschillende data worden verzameld variërend van populatie parameters tot fysiologische kenmerken en dieet. In tegenstelling tot andere diersoorten op zee, besteden zeehonden een deel van hun tijd aan land, dit maakt ze toegankelijk om ook zonder interventie een deel van de nodige metingen te doen. Het zeehondenteam maakt een jaarlijkse populatieschatting van beide soorten zeehonden in Nederland door vliegtuigtellingen boven de drooggevalen zandplaten. Hierbij worden ook pups geteld zodat er een beeld is van de reproductie (Cremer et al. 2017). Daar waar het kan (bij grijze zeehonden) wordt tijdens de voortplanting individuele grijze zeehonden op de platen gevolgd (Brasseur et al. 2015a). Zo mogelijk worden ook uitwerpselen van de dieren verzameld, waaruit een indicatie van het dieet kan worden verkregen (Aarts et al. 2019). Ook wordt ook informatie gewonnen aan de hand van gestrande dieren (Brasseur 2018).

Echter, gemiddeld besteden zeehonden meer dan 80% van hun tijd in open zee, vele tientallen km uit de kust waar ze foerageren. In tegenstelling tot bijvoorbeeld walvisachtigen zijn zeehonden aan de oppervlakte slecht waar te nemen. Juist hier vinden nu grote menselijke ontwikkeling plaats (windparken, zeevaart, zandwinning, aquacultuur).

Om dieren op zee te kunnen volgen en zo begrip te krijgen van de ecologie (evt. veranderingen die plaatsvinden), dienen de dieren van een zender te worden voorzien. Het zenderen levert gegevens over bewegingen (GPS posities op zee) en duikgedrag van de zeehonden gedurende enkele maanden (Brasseur 2017), daarnaast wordt aan de hand van de metingen en bemonstering tijdens het zenderen informatie verzameld over de gezondheid van de dieren (Kroese et al. 2018, Dedert et al. 2015, Bodewes et al. 2015, Ijzer et al. 2014, Kreutzer et al. 2008, Akineden et al. 2007, Van de Vijver et al. 2005, Das et al. 2005), over de populatie structuur (Olsen et al. 2017) en dieet (Aarts et al. 2019, Christianen et al. 2017,). Hierbij is de data verkregen uit de bemonstering ingezet in het kader van (internationale) onderzoek naar de gezondheid, ecologie of populatie van

zeehonden en was extra bemonsteringen niet nodig. Afwegingen bij het zenderen minimaliseren de effecten op de proefdieren en de omgeving.

literatuur:

Aarts, G., S. Brasseur, J. J. Poos, J. Schop, R. Kirkwood, T. V. Kooten, E. Mul, P. Reijnders, A. D. Rijnsdorp and I. Tulp. 2019. Top-down pressure on a coastal ecosystem by harbor seals. *Ecosphere* 10 (2019) 1. 2019.

Akineden, O., J. Alber, C. Laemmler, R. Weiss, U. Siebert, G. Foster, S. Tougaard, S. M. J. M. Brasseur and P. J. H. Reijnders. 2007. Relatedness of *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* strains isolated from harbour seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*) of various origins of the North Sea during 1988 - 2005. *Veterinary Microbiology* 121:158-162.

Bodewes, R., A. Rubio García, S. M. Brasseur, G. J. Sanchez Conteras, M. W. G. Van De Bildt, M. P. G. Koopmans, A. D. M. E. Osterhaus and T. Kuiken. 2015. Seroprevalence of antibodies against Seal Influenza A(H10N7) virus in harbor seals and gray seals from the Netherlands. *PLoS ONE* 10:e0144899.

Brasseur, S. 2018. Stranding and Rehabilitation in Numbers: Population development and stranding data on the Dutch coasts 1990-2016; Analysis of new data from a public database. Wageningen Marine Research report 36 pp.

Christianen, M., J. J. Middelburg, S. Holthuisen, J. Jouta, T. Compton, T. Heide, T. Piersma, J. S. Sinninghe Damsté, H. Veer and S. Schouten. 2017. Benthic primary producers are key to sustain the Wadden Sea food web: stable carbon isotope analysis at landscape scale. *Ecology* 98:1498-1512.

Cremer, J. S. M., S.M.J.M. Brasseur, A. Meijboom, J. Schop and J. P. Verdaat. 2017. Monitoring van gewone en grijze zeehonden in de Nederlandse Waddenzee, 2002-2017. Wettelijke Onderzoekstaken Natuur & Milieu, WMR-rapport C095/17. 40 pp.

Das, K., W. De Coen, E. Esmans, R. Blust, K. I. Van De Vijver, P. Hoff, S. Brasseur, W. Van Dongen and P. Reijnders. 2005. Tissue Distribution of Perfluorinated Chemicals in Harbor Seals (*Phoca vitulina*) from the Dutch Wadden Sea. *Environmental Science & Technology*:6978-6984.

Dedert, M., S. M. J. M. Brasseur and M. J. V. D. Heuvel-Greve. 2015. Zeehonden in het Deltagebied; populatiesontwikkeling en geperfluoreerde verbindingen. IMARES. 32 pp.

Ijzer, J., R. Keesler, M. Kik, S. Brasseur, J. Verdaat, M. Smit and A. Grone. 2014. Pathology in stranded seals in the southern Wadden Sea and North Holland province, The Netherlands, 2009-2013. 28th Annual Conference European Cetacean Society, 5-9 April 2014, Liege, Belgium.

Kreutzer, M., R. Kreutzer, U. Siebert, G. Muller, P. J. H. Reijnders, S. M. J. M. Brasseur, T. Harkonen, R. Dietz, C. Sonne, E. W. Born and W. Baumgartner. 2008. In search of virus carriers of the 1988 and 2002 phocine distemper virus outbreaks in European harbour seals. *Archives of Virology* 153:187-192.

Kroese, M. V., L. Beckers, Y. J. W. M. Bisselink, S. Brasseur, P. W. Van Tulden, M. G. J. Koene, H. I. J. Roest, R. C. Ruuls, J. A. Backer, J. Ijzer, J. W. B. Van Der Giessen and P. T. J. Willemsen. 2018. *Brucella pinnipedialis* in grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbor seals (*Phoca vitulina*) in the Netherlands. *Journal of wildlife diseases* 54:439-449.

Olsen, M. T., V. Islas, J. A. Graves, A. Onoufriou, C. Vincent, S. Brasseur, A. K. Frie and A. J. Hall. 2017. Genetic population structure of harbour seals in the United Kingdom and neighbouring waters. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 27:839-845.

Van De Vijver, K. I., P. Hoff, K. Das, S. Brasseur, W. Van Dongen, E. Esmans, P. Reijnders, R. Blust and W. De Coent. 2005. Tissue distribution of perfluorinated chemicals in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the Dutch Wadden Sea. *Environmental Science & Technology* 39:6978-6984.

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.

Zeehonden worden gevangen en gezenderd waarna ze , binnen 2 uur worden vrijgelaten. De keuze van de zender, maar ook van de vanglocatie en vangperiode, maar ook de ervaring van het vangteam zijn essentieel. Het zeehondenteam is, met meer dan 30 jaar ervaring, gespecialiseerd

om zeehonden in het wild te vangen zenderen en bemonsteren. Projecten worden uitgevoerd na zorgvuldig voorbereiding in overleg met IvD.

Bij de keuze van zender wordt uitgegaan van de meest efficiënte apparaten, waarbij details van locatie, en (duik)gedrag onontbeerlijk zijn. Betrouwbare, langwerkende apparaten zorgen voor een optimale data verzameling en minimaliseert daarmee het aantal proefdieren. Hiertoe werken we ook actief in overleg met de zenderontwerpers de zenders te verbeteren m.b.t. de verzameling van gegevens, en het minimaliseren van het effect op de dieren.

De dieren worden binnen 2 uur gezenderd (mbv. lijm in de haren). Omdat we de dieren een korte tijd vast hebben, wordt ook van de gelegenheid gebruik gemaakt om biometrische gegevens monsters te nemen. Zo mogelijk worden binnen die tijd ook uitwerpselen van de zeehonden op de zandbanken verzameld voor dieetonderzoek. Vervolgens worden van het vrij zwemmend dier gegevens verzameld over (GPS) locatie en duikactiviteit. Deze data wordt periodiek via GSM aan land gestuurd. Tijdens de jaarlijkse rui verliezen de dieren de geplakte zender.

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

Hoewel elke zenderactie op zichzelf staat en met zorg wordt voorbereid in overleg met het IvD, wordt dit ook in een groter kader geplaatst. Omdat de proeven methodisch gelijk zijn, draagt elke nieuw gezenderd dier bij aan de totale gegevens bestand. In dit kader vindt ook een evaluatie van de actie plaats, waarbij de balans in aantal dieren gemonsterd in de tijd en ruimte en de verdeling tussen de seksen en leeftijdsgroepen, wordt gezocht.

In het veld worden alle handelingen gemonitord om de efficiëntie van de vangactie te evalueren en te verbeteren. Direct na het vangen wordt een triage gehouden van de gevangen dieren waarbij alleen die dieren worden gehouden die geen zichtbare gebreken vertonen (mager, slechte vacht, wonden) en voldoen aan de proefbeschrijving (geslacht, leeftijdsgroep) en worden de niet geselecteerde dieren direct vrijgelaten. Deze selectie wordt gedaan door een ervaren onderzoeker.

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	Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild: zenderen en bemonsteren

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR geeft aangaande het project " Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild ".

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD4010020198624**
2. Titel van het project: Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild
3. Titel van de NTS: Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
10.2.e.eng
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 14-08-2019
Aanvraag compleet: 14-08-2019
In vergadering besproken: 26-08-2019
Termijnonderbreking van 28-08-2019 tot 28-08-2019
Aanpassing aanvraag: 28-08-2019
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager
De onderzoeker heeft staande de vergadering telefonisch verhelderend gereageerd op enkele vragen van de DEC en de aanvraag dienovereenkomstig aangepast.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 28-08-2019
Gestelde vragen *en antwoorden*:
 - De DEC wil weten wat de reden is dat men alleen bloed afneemt bij gezonde dieren. Als men de gezondheid van de populatie wil monitoren dan lijkt het voor de hand te liggen om van alle gevangen dieren een bloedmonster/biopt te nemen. Er wordt besloten de onderzoeker te bellen. Zij geeft als antwoord dat de bemonstering enerzijds plaats vindt om retrospectief te onderzoeken wat er aan de hand zou kunnen zijn geweest als een zender onverwachte resultaten laat zien. Anderzijds worden er monsters opgeslagen in een bank zodat die op een later moment gebruikt kunnen worden en internationaal gedeeld kunnen

Wageningen
University & Research

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
29 augustus 2019

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD4010020198624

ONS KENMERK
AVD4010020198624

POSTADRES
Postbus 65
8200 AB Lelystad

BEZOEKADRES
Houtribweg 39
8221 RA Lelystad

INTERNET
www.wur.nl

K/K NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
10.2.e.eng

TELEFOON
10.2.e.eng

E-MAIL
DEC@wur.nl

worden met collega-onderzoekers. De DEC wil dat de onderzoeker het doel van de bloedafname en biopten beschrijft in het project. Ook worden monsters in een bank opgeslagen en beschikbaar gesteld voor verder onderzoek naar gezondheid (Kroese et al. 2018, Dedert et al. 2015, Bodewes et al. 2015, Ijzer et al. 2014, Kreutzer et al. 2008, Akineden et al. 2007, Van de Vijver et al. 2005, Das et al. 2005), over de populatie structuur (Olsen et al. 2017) en dieet (Aarts et al. 2019, Christianen et al. 2017,). Door deze monsterbank wordt voorkomen dat extra vangsten van wilde dieren in het kader van (internationale) onderzoek naar de gezondheid, ecologie of populatie van zeehonden worden uitgevoerd. Aan de hand van de bloed- en vetmonsters wordt ook gekeken of het gedrag, gemeten door de zender, evt. verklaard kan worden uit een afwijkend bloedbeeld, bijvoorbeeld zwangerschap of infectie. Tevens worden deze zenderwaarnemingen en verzamelde monsters in een data- of monsterbank bewaard en dienen deze voor andere onderzoeken aan de gezondheid en gedrag van de zeehonden populatie.

- De DEC wil weten welk ongerief de dieren hebben van het dragen van de zender en of de stroomlijning hierdoor beïnvloed wordt. Gemiddeld is de zender < ~0,5% van het lichaamsgewicht van de zeehonden. Gebaseerd op de zenderdata, zichtwaarnemingen en terug vangsten zijn er geen indicaties dat de dieren ongerief ondervinden van de zender. Zo bleken zwangere vrouwtjes gewoon een jong te krijgen en vielen bij toevallige vangst de dieren na het zenderen binnen de gewone gewichtsrang van dieren van hun lengte. Recent is in samenwerking met andere universiteiten een promotie onderzoek uitgevoerd waaruit de mechanische effecten van de zender bekeken zijn. Naar verwachting zullen de resultaten binnenkort beschikbaar komen en dienen om zo nodig de zender aan te passen om het effect verder te minimaliseren.
 - De onderzoeker heeft 4 categorieën onderzoek aangekruist en vraagt zich af of die allemaal wel van toepassing zijn. Fundamenteel onderzoek lijkt de DEC hier niet aan de orde en de DEC vraagt zich ook af in hoeverre hier sprake is van toegepast onderzoek. De DEC geeft de onderzoeker in overweging om deze 2 categorieën te schrappen. *Ik dacht dat veel van ons werk toegepast wetenschap was, en heb dit daarom aangekruist. Ik begrijp dat in dit kader ander types onderzoek begrepen wordt en heb dit nu weggelaten. Een (groot) deel van ons werk heeft een fundamenteel karakter en de resultaten resulteren in fundamentele wetenschappelijk inzicht. Daarnaast zijn wij bezig ook volledig fundamentele projecten op te zetten (bijvoorbeeld: accelerometrie ontwikkelen voor de zenders om de bewegingen van de zeehonden te onderzoeken), daarom heb ik dit wel aangekruist.*
- 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. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is. Er is geen sprake van samenhang in de zin van opvolgende experimenten. Er is sprake van 1 procedure.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat aangekruiste doelcategorie 'Basic Research' niet in overeenstemming is met de hoofddoelstellingen; datzelfde geldt mogelijk ook voor 'Translational or applied research'. De onderzoeker heeft onderbouwd waarom zij van mening is dat deze categorieën wel van toepassing zijn.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is het verkrijgen en uitbreiden van inzicht in de ecologie en gedrag van zeehonden in de Nederlandse wateren, al dan niet in relatie tot bouwprojecten op zee.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het beschermen en in stand houden van de grijze en de gewone zeehond in hun natuurlijke habitat.
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - Proefdieren: klein nadeel, maximaal matig ongerief, reëel belang van beperkte morele waarde
 - Doeldieren: voordeel, bescherming en in stand houden van de soort, reëel belang van grote morele waarde
 - Ecologisch systeem: Kennis ter ondersteuning van dit systeem dient een reëel belang van grote morele waarde
 - Onderzoekers: klein voordeel, wetenschappelijke output, beperkt belang van beperkte morele waarde
 - Bedrijven/opdrachtgevers: economisch belang, voordeel, kunnen de resultaten gebruiken voor onderbouwing en eventueel aanpassing van (bouw)projecten
 - Maatschappij: kan zowel een voordeel als een nadeel zijn voor bijv. toerisme of energievoorziening
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

DATUM

29 augustus 2019

ONS KENMERK

AVD4010020198624

PAGINA

3 van 4

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. De onderzoeksgroep heeft decennialang ervaring met dit type onderzoek.
8. De DEC heeft vastgesteld dat, na verduidelijking van de onderzoeker, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project o.b.v. de tientallen jaren ervaring.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd maar na het zenderen direct weer vrijgelaten.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: stress door vangen en hanteren, bloedafname, indentificatie aanbrengen, biopteren onder lokale verdoving.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. Het aanbrengen van de indentificatie is een aantasting van de integriteit. In de DEC is gediscussieerd of ook het hebben van een zender een aantasting is van de integriteit. De DEC is tot de conclusie gekomen dat dit geen aantasting is van de integriteit in de zin dat de heilheid en gaafheid van het dier geschonden worden.
13. Er zijn geen humane eindpunten gedefinieerd omdat daar geen aanleiding toe is.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet wordt gekomen aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Het aantal dieren is ingeschat op basis van

DATUM
29 augustus 2019

ONS KENMERK
AVD4010020198624

PAGINA
4 van 4

voorgaande onderzoeken, al dan niet m.b.v. statistische onderbouwing van komende onderzoeksvragen.

16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker verfijnt waar dat mogelijk is o.b.v. ervaringen uit eerder onderzoek.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De dieren worden niet gedood in het kader van het project.
20. Herplaatsing of hergebruik: n.v.t.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: weegt het zenderen en bemonsteren van maximaal 500 zeehonden in 5 jaar met eenmalig matig ongerief op tegen het doel om beleid te ondersteunen dat het leefgebied van zeehonden veiligstelt.
2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een positieve bijdrage kan leveren aan het beschermen en in stand houden van de grijze en de gewone zeehond in hun natuurlijke habitat.
De belanghebbenden, hun morele waarden en de weging is vermeld onder C.5. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Zij ervaren maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen binnen het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de ecologie en gedrag van zeehonden met maximaal matig ongerief voor maximaal 500 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.
De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Onderstaande knelpunt is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
 - De DEC merkt op dat er bij dit onderzoek geen voordeel voor het ecologisch systeem te behalen is voor de locatie/het project waar men het onderzoek uitvoert (bijv. onderzoek tijdens het bouwen van een windmolenpark op zee). Immers, voor dat specifieke project staat men dan voor een voldongen feit. De resultaten kunnen wel van invloed zijn op soortgelijke projecten in de toekomst.

Met vriendelijke groet,

10.2 .e. en g

secretaris DEC WUR



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Wageningen Research

10.2.e. en g

Postbus 59

6700 AW WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD4010020198624

Bijlagen

1

Datum 9 september 2019

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e. en g

Op 14 augustus 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild" met aanvraagnummer AVD4010020198624. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 10 september 2019 tot en met 1 juni 2024.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Wageningen UR. Dit advies is ontvangen op 29 augustus 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Datum:

9 september 2019

Aanvraagnummer:

AVD4010020198624

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:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
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: Stichting Wageningen Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AW WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 10 september 2019 tot en met 1 juni 2024, voor het project "Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild" met aanvraagnummer AVD4010020198624, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is .

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 14 augustus 2019
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 29 augustus 2019;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild: zenderen en bemonsteren, zoals ontvangen op 29 augustus 2019;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 augustus 2019;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 29 augustus 2019.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Ecologie en gedrag van zeehonden in het wild: zenderen en bemonsteren			
	Andere zoogdieren (andere Mammalia) / grijze en gewone zeehonden (Halichoerus grypus en Phoca vitulina)	500	100,0% Matig

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.

Aanvraagnummer:
AVD4010020198624

- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD4010020198624

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 onvermijdelijk 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:

AVD4010020198624

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).

Wilde dieren

Het vangen van wilde dieren moet volgens artikel 10f van de wet door een deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.



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.

Aanleiding en achtergrond

Veel van de in Nederland voorkomende inheemse zoogdieren zijn strikt beschermd krachtens de Wet natuurbescherming, al dan niet voortvloeiend vanuit Europese regelgeving via de Habitatrichtlijn. Van de circa 57 in Nederland voorkomende zoogdieren, staan de volgende soorten op de Habitatrichtlijn vermeld: bever, boommarter, bunzing, hamster, [10.2.e.eng](#), Noordse woelmuis, otter, wilde kat, wolf, alle vleermuissoorten en drie zeezoogdieren. Daarnaast zijn er diverse soorten die geen Europese bescherming genieten via de Habitatrichtlijn, maar wel via de Wet natuurbescherming op provinciaal niveau zijn beschermd omdat er aanwijzingen bestaan dat het erg slecht gaat met deze soorten. Dit geldt bijvoorbeeld voor de kleine marterachtigen zoals hermelijn of wezel. Dit projectvoorstel richt zich op in de Nederlandse natuur voorkomende, inheemse en uitheemse kleine zoogdieren. Hieronder worden geen zeezoogdieren verstaan, noch evenhoevigen (bijv. hertachtigen, wild zwijn), onevenhoevigen (paardachtigen) en wolf.

Verschillende kleine zoogdieren zijn zeer zeldzaam (geworden) en worden in hun voorkomen sterk bedreigd. Populaties nemen steeds meer af omdat ze onder druk staan door bekende of onbekende redenen. Om duurzame instandhouding van populaties te kunnen waarborgen, blijft het noodzakelijk dat kennishiaten worden gevuld. Kennis van de ecologie en habitatgebruik is voor veel algemene soorten reeds inzichtelijk, echter van diverse lastig waar te nemen soorten zoals vleermuizen en kleine marterachtigen is van de ecologische sleutelfactoren nog zeer weinig bekend (bijv. waar overwinteren dieren, wat zijn migratieafstanden naar voortplantingsgebieden of in welk type habitat verblijven dieren buiten de voortplanting?). Door nieuwe technologische ontwikkelingen wordt het mogelijk om steeds nauwkeuriger en betrouwbaarder inzicht te krijgen in sleutelfactoren die van grote invloed zijn op het duurzaam voortbestaan van soorten. Telemetrische toepassingen zoals het gebruik van bijvoorbeeld GPS-trackers, radio-transmitters en RFID-tags in de ecologie bieden in algemene zin de mogelijkheid de kennis te vergroten voor bedreigde en niet-bedreigde soorten. Echter, om dergelijk onderzoek uit te voeren, worden handelingen met wilde dieren in hun natuurlijke habitat verricht waarbij het ongerief na het vangen zodanig kan zijn dat dit gelijk of hoger is aan de ongeriefdrempel voor een dierproef. Zodoende kan een onderzoek binnen de kaders van de Wet op de dierproeven vallen en is er dus sprake is van een vergunningplichtige dierproef (CCD 2018, Handreiking 'Dierproeven met wilde dieren in hun biotoop').

Telemetrische technieken

Met telemetrische technieken wordt het plaatsen en volgen van een zender, intern of op (extern) een dier, bedoeld. Bij kleine zoogdieren in Nederland wordt telemetrie sinds geruime tijd toegepast. Sinds de jaren '80 zijn bijvoorbeeld radio-transmitter-implantzenders gebruikt bij kleine marterachtigen als bunzing en steenmarter om meer te weten te komen over het leefgebiedgebruik (Volkers 1980; Müskens & Broekhuizen 1998, 2005). Telemetrisch onderzoek sinds deze periode toegepast bij watergebonden zoogdieren als muskusrat (Verbeylen 2002; Driessen 2014) en bever (Notet & Kapteyn 1991), landgebonden zoogdieren als [10.2.e.eng](#)), wilde kat (Janssen et al. 2016), vos (Mulder 2009) en verschillende marterachtigen (Volkers 1980; Müskens & Broekhuizen 1998, 2005. Mulder 2016) en diverse vleermuissoorten (Haarsma 2006; Dekker & Limpens 2007; Janssen et al. 2016; Lagerveld 2017; [10.2.e.eng](#)).

Zoals vermeld is van sommige kleine zoogdiersoorten nog bijzonder weinig bekend van de ecologie. De sleutel voor het wegnemen van bedreigingen is waarschijnlijk voor een deel in de ecologie van deze soorten te vinden, echter aangezien deze soorten zo'n sterk verborgen leefwijze hebben, is het zeer lastig om dieren in het veld op te sporen en hun gedrag te onderzoeken. Bovendien gaat frequent opsporen en vangen gepaard met stress en het risico op onnatuurlijke gedrag als gevolg daarvan. Telemetrisch onderzoek maakt het mogelijk om deze wilde dieren actief in hun habitat op te sporen, zonder de dieren bloot te stellen aan stress of in het natuurlijke gedrag te verstoren. In vergelijking met regulier onderzoek, waarbij dieren iedere keer worden gevangen met alle nodige stress van dien, wordt voor het plaatsen van een zender het dier slechts éénmaal gevangen. Voor het zenderen met transponders worden dieren eerst gevangen waarna, eventueel onder adequate anesthesie (bij stressgevoelige of moeilijk te hanteren soorten), een transponder subcutaan tussen de schouderbladen wordt geplaatst. Voor zenderen met radiotransmitters of GPS-trackers wordt de zender, eventueel onder

adequate anesthesie (bij stressgevoelige of moeilijk te hanteren soorten), op het dier vastgemaakt. De manier van het aanbrengen van radiotransmitters/GPS-trackers kan op drie manieren, via een halsband, vastplakken op de vacht of een "harnas". De aanbrengmanier wordt bepaald aan de hand van de levenswijze van een soort op basis van expert judgement.

Gezien de relatief zware ingreep van het onder anesthesie intraperitoneaal inbrengen van een zender dat door een bevoegde biotechnicus (art 13f2 of art 9) of dierenarts dient te worden gedaan, is deze manier van zenderen niet in dit projectvoorstel opgenomen. Wanneer er bij 10.2.e.eng een offerteverzoek binnenkomt waarbij een dergelijke methode dien te worden toegepast, zal hier amendement voor worden aangevraagd en de samenwerking met een ervaren biotechnicus of dierenarts worden gezocht.

Over 10.2.e.eng

10.2.e.eng

Nederland heeft zich geconformeerd aan de instandhouding, bescherming en herstel van haar biodiversiteit volgens diverse internationale verdragen waarbij onder andere de internationale Habitatrictlijn richtinggevend is. De Habitatrictlijn is in principe een uiting van het belang van biodiversiteit vanuit de (Europese) maatschappij. Het Nederlandse natuurbeleid is sinds de inwerkingtreding van de Wet natuurbescherming, gedecentraliseerd naar provincies en verantwoordelijkheden zijn soms doorgedelegeerd naar terreinbeherende organisaties. Over de maatregelen en bereikte doelen voor beschermde soorten die vermeld staan op de Habitatrictlijn, dient het Ministerie van LNV zesjaarlijks te rapporteren aan de Europese Commissie. Voor details hierover wordt verwezen naar punt 3.3 van dit projectvoorstel.

2. Vanwege het feit dat 10.2.e.eng vooral voor externe opdrachtgevers werkt, is het niet mogelijk om precies te weten welke opdrachten de komende jaren binnen zullen komen. Opdrachtgevers betreffen meestal overheidsinstellingen, zoals provincies, Rijkswaterstaat en waterschappen. Het zijn voor een groot deel organisaties die verantwoordelijk zijn voor de bescherming en duurzame instandhouding van soorten en hun habitats. De opdrachtgevers zijn op de hoogte van wat er speelt binnen hun beheergebied, waardoor de kans op herhaling van een reeds eerder uitgevoerd onderzoek klein is. Daarnaast wordt door 10.2.e.eng in het eigen netwerk bij collega-onderzoeksbureau's en -onderzoeksinstituten nagegaan of er sprake van herhaling van een onderzoek. Daarnaast vindt screening van wetenschappelijke databases plaats (bijv. via Web of Science). Wanneer een offerteverzoek binnenkomt, worden de wensen van de opdrachtgever altijd besproken en afgestemd met de lokale IvD (dit is schematisch weergegeven in figuur 1). Deze voorwaarden zijn:

- 1 Moet kennisleemtes aanpakken over relevante ecologische aspecten;
- 2 De uitkomsten moeten handvatten bieden voor een adequatere duurzame bescherming van populaties en hun habitat;
- 3 Een kritische beoordeling van de relevantie en de haalbaarheid van een verzoek moet worden vastgelegd;
- 4 Via het netwerk van 10.2.e.eng en de opdrachtgever wordt nagegaan of er sprake kan zijn van herhaling van een reeds eerder uitgevoerd soortgelijk onderzoek.

Behalve de eerder genoemde voorwaarden 1 tot en met 4 wordt het offertezoek vervolgens getoetst op het kunnen waarborgen van het welzijn van de proefdieren. Door na te gaan of een bepaalde onderzoeksmethodiek toepasbaar is voor een bepaalde diersoort, in die zin dat het welzijn van de proefdieren in voldoende mate gewaarborgd kan worden. Alsmede of de ingeschatte ongeriefklasse niet wordt overschreden. Indien nodig vindt in overleg met de opdrachtgever bijsturing van de onderzoeksvragen plaats. Door dit traject te volgen worden zowel **10.2.e.eng** als de opdrachtgever gedwongen om kritisch te kijken naar een onderzoeksvraag (en het bijbehorende plan van aanpak). Vervolgens wordt een plan van aanpak opgesteld waarin wordt bepaald en onderbouwd welke onderzoeksmethoden zullen worden toegepast. In een aantal gevallen wordt het op dat moment pas duidelijk of onderdelen van de opdracht al dan niet binnen de kaders van de Wet op de Dierproeven vallen. Wanneer blijkt dat de opdracht binnen de kaders van de Wet op de Dierproeven valt, wordt volgens het stappenplan van de IvD **10.2.e.eng** gewerkt (figuur 1).

Toelichting bij figuur 1

1. De opdrachtgever heeft een onderzoeksvraag. De lokale IvD toetst of de onderzoeksvraag voldoet aan de hierboven gestelde voorwaarden en of er geen sprake is van eerder uitgevoerd onderzoek (geen herhaling).
2. Indien de onderzoeksvraag hiermee niet in strijd is, volgt een offertezoek van de opdrachtgever. Aangezien de te onderzoeken soorten (en aantallen) per onderzoeklocatie of -project sterk kunnen verschillen wordt voor elke opdracht die binnenkomt wordt telkens dezelfde strategie doorlopen aan de hand van het stappenplan.
3. Er wordt afgestemd met de lokale IvD om de opdracht te bespreken en de inhoud van een intern werkprotocol te bespreken.
4. Op basis hiervan en literatuur-vooronderzoek wordt een intern werkprotocol opgesteld.
5. Het werkprotocol wordt afgestemd met de IvD en waar mogelijk verfijnd. Om de integriteit te waarborgen wordt de afstemming met de IvD schriftelijk vastgelegd.
6. Na goedkeuring door de IvD kan de uitvoering van start gaan.



Figuur 1 Te doorlopen stappenplan bij opzet van een onderzoek.

10.2.e.eng is via het 10.2.e.eng gemachtigd het voor het gebruik van 10.2.e.eng welke naar de overgang van naar 10.2.e. haar geldigheid heeft behouden. De 10.2.e.eng, geldt onder meer voor de 10.2.e.eng

Meestal gaat het om één te onderzoeken (doel)soort. Maar soms gaat het om relaties tussen de doelsoort en andere soorten. Op basis hiervan worden de onderzoeken deelpopulaties en het aantal dieren per deelpopulatie vastgesteld. Omdat het altijd om wilde dieren gaat betreft de onderzoeksoepzet altijd maatwerk en worden afwegingen gedaan waarbij zo min mogelijk, doch genoeg, dieren gebruikt worden. Waar mogelijk, worden onderzoeksvragen met betrekking tot dezelfde diersoorten gecombineerd om dit te laten leiden tot het gebruik van minder dieren.

De hier beschreven dierproeven zijn slechts een klein deel van de feitelijke werkzaamheden die 10.2.e.eng uitvoert. De dierproeven behelzen vaak één onderzoeksvraag binnen groot overkoepelend onderzoek, waarvan het overige onderzoek (10.2.e.eng, etc.) buiten de kaders van de Wet op de dierproeven valt.

Geraadpleegde literatuur

CCD (2018) Dierproeven met wilde dieren in hun biotoop - Versie December 2018. Centrale Commissie Dierproeven, Den Haag

Dekker, J. & H. Limpens (2007) Ingekorven vleermuizen op de kaart. Zoogdier 18(3): 7-10

Driessen, C. (2014) Veldproef muskusratten | Pilot zenderonderzoek. 2014.15 Bureau van de Zoogdierverseniging, Nijmegen

Haarsma, A.-J. (2006) De meervleermuis: ver weg of dichtbij in de winter? Zoogdier 17(1): 11-14

10.2.e.eng

Janssen, R & J.J.A. Dekker, J.L. Mulder, A. Brouns & L. Linnartz, 2016. De wilde katten van het Vijlenerbos. Onderzoek naar het tereingebruik in 2014-2015. Bionet (Stein) / Jasja Dekker Dierecologie (Arnhem) / Bureau Muldernatuurlijk (Groenekan)

Janssen, R., A.-J. Haarsma & S. Lagerveld, (2016) Pilotonderzoek vleermuizen vangen en volgen over zee. IMARES Rapport [C038/16]

10.2.e.eng

Lagerveld, S., Janssen, R., Manshanden, J., Haarsma, A.-J., de Vries, S., Brabant, R. & Scholl, M. (2017) Telemetry for migratory bats – a feasibility study (Nr. C011/17) Wageningen University & Research

10.2.e.eng

Mulder, J.L. (2009) Een vos met een tomtommetje. Zoogdier 19(4): 7-9

Mulder, J.L. (2016) De dassen langs de A27 tussen Utrecht en Hilversum. Bureau Mulder-natuurlijk, Groenekan

Müskens, G.J.D.M. & S. Broekhuizen (1998) Het leefgebied van een Bunzing. De Levende Natuur 99(5): 185-188

Müskens, G.J.D.M. & S. Broekhuizen (2005) De steenmarter (*Martes foina*) in Borgharen: aantal, overlast en schade. Wageningen, Alterra, Alterra-rapport 1259

Notet, B. & K. Kapteyn (1991) Hoge sterfte onder de Biesbosch bevers. Zoogdier 91(2): 5-7

Verbeylen, G. (2002). Telemetrie en merken: praktische toepassingen bij eekhoorns en muskusratten. Lutra 45-2, 182-186

10.2.e.eng

Volkers, F. (1980) Radiotelemetrisch onderzoek m.b.t. het terreingebruik van Bunzing (*Putorius putorius* Linn.) en Steenmarter (*Martes foina* Ere). Rapport Rijksinstituut voor Natuurbeheer, Arnhem

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 uiteindelijke doel van het onderzoek in deze aanvraag is bescherming van in Nederland inheemse kleine zoogdieren. Alle in punt 3.1 beschreven punten voorzien in de algemene behoefte om meer kennis te verzamelen over inheemse en uitheemse soorten met als doel duurzame instandhouding, herstel en uitbreiding van in Nederland bedreigde inheemse soorten. Het gaat hier altijd om onderzoek van of met externe opdrachtgevers en dat het op dit moment daarom niet mogelijk is concrete directe doelen te benoemen. Op basis van bovenstaande structuur wordt één type dierproef aangewend, namelijk telemetrisch onderzoek. Hieronder staan de onderzoeksvragen die onder dit project uitgevoerd zouden kunnen worden bij alle kleine zoogdieren.

- Waar bevinden zich migratieroutes, onder welke omstandigheden vindt migratie plaats en welke afstanden worden hierbij afgelegd?
- In hoeverre vindt uitwisseling tussen populaties plaats en kan hieruit worden opgemaakt of er dispersieknelpunten tussen leefgebieden bestaan?
- Waar bevinden zich voortplanting- en kraamlocaties in de habitat en wat wijkt het gedrag van een soort af gedurende de voortplantingsperiode?
- Van welke microhabitats maakt een soort gebruik binnen een leefgebied, is er sprake van een duidelijke voorkeur voor bepaalde terreindelen of komen dieren willekeurig verspreid voor?
- Waar bevinden zich de overwinteringsplaatsen? Is er een verschil tussen zomer- en winterhabitat?
- Kunnen knelpunten voor een soort ten aanzien van het omliggend landgebruik (bijv. intensief agrarisch) worden aangetoond?

3.3 Belang

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

De benoemde onderdelen die in dit projectvoorstel aan bod komen zijn uiteindelijk gericht op in zowel een toename als het duurzaam het behoud van biodiversiteit, dat op zijn beurt zowel een wetenschappelijk als maatschappelijk belang dient (Sandifer et al. 2015).

De beschikbare wetenschappelijke literatuur is doorgaans niet geheel bruikbaar omdat populaties die zijn onderzocht in het buitenland vaak aanzienlijk groter van omvang zijn dan de Nederlandse en de habitats en het habitatgebruik aanzienlijke verschillen kunnen vertonen. Als voorbeeld kan hier worden genoemd dat vuursalamanders in België en Frankrijk zich succesvol voortplanten in geïsoleerde stilstaande wateren terwijl de soort hiervoor in Nederland strikt gebonden is aan bronbeeksystemen. Vaak is het wel zo dat beschikbare wetenschappelijke literatuur uit het buitenland goede aanknopingspunten biedt voor het opzetten van (vervolg)onderzoek, alsmede voor onderbouwing van verkregen onderzoekresultaten kan worden gebruikt. Voor bescherming van de Nederlandse populaties kleine zoogdieren is aanvullend onderzoek echter vaak noodzakelijk om sleutelfactoren voor adequatere bescherming op gebiedsniveau te achterhalen en te vertalen naar een effectief beheer.

Zowel vanuit de internationale richtlijnen, de eerdere investeringen als natuurbescherming is onderzoek naar de ecologie en het habitatgebruik van soorten die staan vermeld op de Europese Habitatrichtlijn van groot maatschappelijk belang. Nederland heeft zich geconformeerd aan de instandhouding, bescherming en herstel van haar biodiversiteit volgens diverse internationale verdragen waarbij onder andere de internationale Habitatrichtlijn en Vogelrichtlijn richtinggevend zijn. Deze richtlijnen regelen de bescherming van soorten en habitats op Europees niveau. Deze Europese richtlijnen zijn verankerd in de

Wet natuurbescherming. Soorten die zijn opgenomen op de Habitatrichtlijn zijn krachtens de Wet natuurbescherming streng beschermd en Nederland heeft voor deze soorten de verplichting en verantwoordelijkheid vanuit de EU voor het behouden van een gunstige staat van instandhouding van populaties. Het niet nakomen van deze Europese verplichtingen kan leiden tot hoge boetes en dwangsommen (Sanders et al. 2016). Sinds de inwerkingtreding van de Wet natuurbescherming is de soortenbescherming gedecentraliseerd naar de provincies, dus provincies zijn belast met de taak van de duurzame instandhouding van beschermde soorten. Omdat soorten vaak in gebieden voorkomen die in eigendom en beheer van terreinbeherende organisaties (bijv. Staatsbosbeheer of Natuurmonumenten) zijn, zijn verantwoordelijkheden voor soortenbescherming soms gedeeltelijk doorgedelegeerd naar deze organisaties. Over de maatregelen en bereikte doelen voor beschermde soorten die vermeld staan op de Habitatrichtlijn, dient het Ministerie van LNV zesjaarlijks te rapporteren aan de Europese Commissie (Schmidt et al. 2014). Voor de totstandkoming van de landelijke, zesjaarlijkse rapportages dient veldonderzoek te worden verricht waar onder meer provincies, waterschappen, Rijkswaterstaat, gemeentes en terreinbeherende organisaties voor aan de lat staan. 10.2.e.eng kan door deze organisaties worden ingeschakeld om het veldonderzoek uit te voeren, dat soms proefdiervergunningplichtig is. Ook voor soorten die niet beschermd zijn via de Europese Habitatrichtlijn maar waarvoor nationale bescherming geldt, wordt 10.2.e.eng door bovengenoemde organisaties ingeschakeld om te onderzoeken hoe het met deze soorten ervoor staat.

Geraadpleegde literatuur

Sanders M.E. et al. (2016) Derogatierapportages Vogelrichtlijn, Habitatrichtlijn en Bern Conventie; Nut en noodzaak, evaluatie, handleiding en vooruitblik. Wageningen, Alterra Wageningen UR (University & Research centre), Alterra-rapport 2696

Sandifer P.A. et al. (2015) Exploring connections among nature, biodiversity, ecosystem services, and human health and well-being: Opportunities to enhance health and biodiversity conservation. Ecosystem Services 12: 1-15

Schmidt, A.M. et al. (2014). Rapportages op grond van de Europese Vogelrichtlijn en Habitatrichtlijn. Evaluatie rapportageperiode 2007-2012 en aanbevelingen voor de periode 2013-2018. Wettelijke Onderzoekstaken Natuur & Milieu. WOt-technical report 19

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Alle onderzoeken van 10.2.e.eng die betrekking hebben op kleine zoogdieren worden geïnitieerd door externe opdrachtgevers (zie onderdeel 3.1 Over 10.2.e.eng). De voorgestelde strategie die wordt gehanteerd is weergegeven in figuur 1 en staat besproken in onderdeel 3.1.

10.2.e.eng heeft momenteel twee onderzoeken lopen waarbij kleine zoogdieren worden gezenderd, namelijk onderzoek naar overwinteringsplekken 10.2.e.eng

10.2.e.eng

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

- 1) Bepalen onderzoeksmethode: locaties vaste antennes en aanvullend onderzoek met draagbare apparatuur.
- 2) Keuze te zenderen soorten en streefaantallen

- 3) Vangen en zenderen van dieren.
- 4) Verzamelen terugmeldingen.
- 5) Evaluatie

In de derde stap vindt de dierproef plaats: het vangen van dieren, eventueel sedatie en implanteren van de transponder of het aanbrengen van een tijdelijke radiotransmitter op de vacht via een halsband, harnas of lijmen.

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 logische samenhang van de in punt 3.4 beschreven onderdelen (deelprojecten) is uiteindelijk bescherming en instandhouding van inheemse kleine zoogdieren. Omdat **10.2 e. en g** op projectmatige basis werkt, is het niet op voorhand al vast te stellen welke opdrachten de komende vijf jaar zullen volgen. Voorafgaand aan iedere opdracht wordt een passend (maatwerk) werkprotocol opgesteld conform een gestandaardiseerd stappenplan (figuur 1). Daarnaast worden alle opdrachten jaarlijks geëvalueerd met de lokale IVD.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Telemetrisch onderzoek
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD^{10.2 e. en g}20198964 / 2019-0038
2. Titel van het project: Telemetrisch onderzoek aan wilde, kleine zoogdieren t.b.v. soortbescherming en -instandhouding
3. Titel van de NTS: Telemetrisch onderzoek aan wilde, kleine zoogdieren t.b.v. soortbescherming en -instandhouding
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 06-11-2019
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 12-11-2019
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 18-11-2019 tot 10-01-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 10-01-2020
 - advies aan CCD: 30-01-2019
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 18-11-2019
 - Datum antwoorden: 10-01-2020
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

- 3.1: De commissie neemt aan dat u bedoelt dat frequent vangen gepaard gaat met stress en het risico op onnatuurlijk gedrag. Anders zou dit ook een argument tegen telemetrisch onderzoek zijn.

Antwoord: Dit bedoel ik inderdaad. Ik heb de term "frequent" aan de tekst toegevoegd.

- 3.1: Bij punt 3 (alinea 'Over ^{10.2 e. en g}) kunt u de term "afweging" beter vervangen door "beoordeling", om elke schijn dat er op dat moment nog een ethische afweging plaatsvindt te vermijden. Dat u op het moment dat een verzoek binnenkomt beoordeelt of de data die de opdrachtgever wil hebben relevant zijn voor het doel waarvoor hij ze wil hebben en of het

verzamen van die gegevens haalbaar is, is natuurlijk logisch. De afweging dat, als de data relevant zijn, het belang van het verzamelen van de data opweegt tegen de ingreep in het leven van wilde dieren, is echter al in een eerder stadium door de DEC gemaakt. De gegevens die u in de aanvraag verstrekt over het type data dat u verzamelt en de doelen waarvoor dat gebeurt, dienen dus die afweging door de DEC mogelijk te maken. Naar het oordeel van de DEC is dat in deze aanvraag het geval.

Antwoord: Hartelijk dank voor dit commentaar en de uitgebreide onderbouwing ervan. Hier kan ik me goed in vinden en zoals u hebt gesuggereerd heb ik de term "afweging" vervangen door "beoordeling".

Description of Animal Procedures:

*DAP1

- A2: U schrijft dat de externe transmitter 'Na anesthesie' wordt aangebracht. Bedoelt u onder anesthesie?

Antwoord: Dit bedoel ik inderdaad. Ik heb de term "Na" vervangen door "Onder".

- A3 en B: Kunt u iets duidelijker aangeven hoeveel transponders / zenders doorgaans verloren gaan (uit eigen ervaring) en op welke manier u daarmee rekening houdt bij het berekenen van het aantal te zenderen dieren? M.a.w. hoeveel dieren moet u zenderen om van 10 dieren bruikbare data te verkrijgen, en verschilt dit misschien ook per diersoort?

Antwoord: Ja dit verschilt inderdaad per diersoort. Ik heb wat zinnen verwijderd en het volgende toegevoegd aan de tekst:

De kans op natuurlijke uitval is bij knaagdieren bijvoorbeeld groter door predatie dan bij roofdieren. Bij hazelmuizen hebben we geconstateerd dat we na afloop van de helft (10/20) van de dieren met zekerheid niet gepredeerd was. Een aantal dieren werd teruggevonden in een bosuil-braakbal maar ook zijn twee dieren spoorloos verdwenen en dus mogelijk gepredeerd (10.2 .e. en g

Bij het laatvliegeronderzoek (vleermuizen) is het zo dat waarschijnlijk geen van de dieren is gepredeerd maar vanwege de mobiliteit van de dieren, een aantal zijn zoekgeraakt. Een voorbeeld hiervan is dat één van de dieren m.b.v. een Cessna vliegtuig werd teruggevonden op 13 km van de laatst bekende plek aan de andere kant van de Maas (10.2 .e. en g
Twee dieren konden niet meer worden teruggevonden. Om de effectieve steekproefgrootte van mobiele soorten vanwege het risico van 'kwijtraken' te waarborgen, dienen dus voldoende dieren te worden gezenderd. 20 dieren is aan de veilige kant.

Tot slot bestaat er dan nog het risico dat de techniek faalt. Bij hazelmuizen hebben we geconstateerd dat batterijen van zenders in een uitzonderlijk geval slechts 2/3 van de opgegeven levensduur meegaan.

Op grond van het bovenstaande met het oog op uitval wordt het gebruik van 20 dieren per onderzoek als een verantwoorde steekproefgrootte geacht. Het risico op technisch falen of het zoekraken van dieren bij respectievelijk langer lopende onderzoeken of nog meer mobiele soorten, kan de overweging voor het gebruik van meer dieren rechtvaardigen.

- B: De rekensom voor het aantal kleine zoogdieren klopt niet.

Antwoord: Slordig van me, excuses. Nu klopt alles.

- D: Vervanging: de commissie neemt aan dat u vervangen bedoelt in plaats van vangen.

Antwoord: Dat is juist (wij ecologen denken natuurlijk direct aan vangen...), ik heb "ver" voor het woord "-vangen" gezet.

- E: Is een aantal van deze experimenten niet wettelijk verplicht in het kader van (EU-) wetgeving? Zo ja, kunt u dan toelichten waarom herhaling noodzakelijk is of hoe u er voor zorgt dat onnodige herhaling wordt voorkomen?.

Antwoord: De experimenten op zichzelf zijn niet wettelijk verplicht in het kader van de EU-wetgeving. Echter, soortinstandhouding via beter passende bescherming wél. En om soorten beter te beschermen dient de ecologie doorgaans beter te worden begrepen, waarvoor dierproeven noodzakelijk zijn. Het volgende heb ik toegevoegd aan de tekst:

Via het eigen netwerk van collega-onderzoekers en -opdrachtgevers wordt altijd nagegaan of deze onderzoeken al zijn uitgevoerd. Aangezien de onderzoekswereld van wilde zoogdieren in Nederland en België zeer klein is, wordt snel duidelijk of dergelijke onderzoeken al eerder zijn uitgevoerd. Bovendien zijn de opdrachtgevers op de hoogte van welke opdrachten zij eerder hebben uitgezet.

Daarnaast wordt met behulp van de wetenschappelijke zoekmachine Google Scholar en Web of Knowledge nagegaan of dergelijke studies met een voor de Nederlandse fauna representatieve situatie reeds zijn uitgevoerd. Indien dit het geval is, wordt overwogen in welke mate de beoogde dierproef meerwaarde heeft ten aanzien van de huidige kennis.

-H: U zult geen pijnbestrijding toepassen. Waarom heeft u ja aangekruist?

Antwoord: Ik was in de veronderstelling dat het toepassen van anesthesie valt onder het toepassen van pijnbestrijding. Dit is niet het geval en heb de vraag met "nee" beantwoord en het volgende toegevoegd aan de tekst:

Het plaatsen van een transponder of een transmitter wordt, met uitzondering van vleermuizen, gedaan onder verdoving (anesthesie). De afweging hiervan is dat door de stressgevoeligheid van de meeste diersoorten, dieren kunnen doodgaan van de stress tijdens het hanteren. Na afloop worden geen pijnverlichtingsmethoden toegepast omdat de ingreep van zodanig korte duur is dat het dier hier waarschijnlijk weinig last van heeft. Bovendien zal het toepassen van pijnverlichtingsmethoden het dier waarschijnlijk sterk belemmeren in het uitoefenen van het natuurlijk gedrag alsmede kans op predatie (dier is tijdelijk verzwakt) eveneens vergroten.

Extra onderbouwing:

Het subcutaan plaatsen van een transponder bij vleermuizen gebeurt zonder anesthesie. De afweging om geen anesthesie toe te passen bij vleermuizen is dat het bereiken van anesthesie voor meer ongerief zorgt dan het plaatsen van een transponder. Bovendien bestaat het risico dat door toedienen van anesthesie vleermuizen in torpor raken en hier zeer lastig uit komen en wellicht sterven.

Bij de behandeling is voor kleine zoogdieren een afweging gemaakt om anesthesie toe te passen bij het subcutaan plaatsen van een transponder, of het extern aanbrengen van een transmitter gezien de stressgevoeligheid van de meeste soorten. Een geschikte dosering wordt vooraf bepaald in overleg met een ervaringsdeskundige op dit gebied. Na de ingreep wordt het dier indien nodig maximaal 24 uur in de gaten gehouden, onder zo natuurlijk mogelijke omstandigheden. Wanneer een individu volledig bijgekomen is en geen zichtbare verdovingsverschijnselen meer worden vertoond, wordt het, al dan niet meteen, teruggeplaatst in de natuurlijke omgeving.

-J: U zult wilde dieren vangen, en u beschrijft dat een gewond of ziek dier niet wordt gebruikt voor de dierproef. Kunt u uitleggen waarom u deze dieren niet wilt gebruiken voor uw dierproef? Wat zult u doen in het geval dat u gewonde of zieke dieren vangt en waarom? Artikel 10f lid 4 van de Wet op de dierproeven stelt dat zieke of gewonde wilde dieren onderzocht dienen te worden door een dierenarts of andere ter zake deskundige persoon, en maatregelen getroffen dienen te worden om de dieren zo min mogelijk te laten lijden. Hiervan kan worden afgeweken indien daarvoor een wetenschappelijke motivering bestaat (lid 5). Ook kan het bij zieke dieren van belang zijn om verder onderzoek te doen naar de oorzaak daarvan, of in elk geval te signaleren dat dit nodig is.

Antwoord: Dat klopt. Als onderbouwing heb ik het volgende toegevoegd aan de tekst:

Als er een gewond of ziek wordt gevangen, wordt deze niet gebruikt voor de dierproef. De reden hiervan is dat het gebruik van zieke dieren de kans op uitval, zoals beschreven bij punt A2, sterk wordt vergroot en er ook sterke twijfel bestaat of verkregen resultaten van onderzoek aan zieke dieren representatief zijn voor een gezonde populatie.

Personeel van 10.2.e.en.g zijn ter zake deskundige personen (art. 9 of 13f2). Ze maken een inschatting of het zieke dier herstelmogelijkheden heeft of niet. In het eerste geval wordt het dier losgelaten. Is dit niet het geval dan wordt het dier ter plekke geëuthanaseerd conform bijlage IV van richtlijn 2010/63 EU door middel van een overdosis anesthesie.

-K: Voor de 300 vleermuizen is het ongerief ingeschat als licht. Het ongerief voor de 200 niet-vleermuizen wordt ingeschat als licht voor 20% (40 dieren) en matig voor 80% (160 dieren) van de dieren. Deze aantallen komen niet geheel overeen met de aantallen in de NTS.

Antwoord: De aantallen in de NTS zijn kloppend gemaakt in overeenstemming met de percentages in de DAP:

	<i>licht</i>	<i>matig</i>
<i>Aantal</i>	<i>340 (68%)</i>	<i>160 (32%)</i>

Niet-technische samenvatting:

-U wordt verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Beantwoording en aanpassingen in het Project Proposal en DAP zijn doorgevoerd in de NTS.

- 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 vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag betreft onderzoek aan wilde, kleine zoogdieren gericht op het behoud van de diersoort. De aanvrager doet hiernaar onderzoek in opdracht van derden, veelal om te kunnen voldoen aan de gevraagde rapportages over de stand van zaken met betrekking tot beschermde diersoorten in het kader van Europese wetgeving.
De expertise van de aanvrager ligt met name op het gebied van natuurwetgeving, inventarisatie en monitoring, inrichting en beheer, en soortbescherming. Voor sommige werkzaamheden zijn dierproeven met dieren in het wild noodzakelijk. De exacte vraagstelling van het in opdracht voor derden uit te voeren vergunningplichtig onderzoek is nog niet bekend, maar het doel is steeds soortbescherming, herstel en instandhouding van wilde, kleine zoogdieren in Nederland. De dierproeven die in het kader van dit onderzoek zullen plaatsvinden zijn wel bekend: het betreft telemetrisch onderzoek. Hiermee kunnen kennishiaten over de ecologie van de onderzochte soorten worden ingevuld, waardoor duidelijker wordt welke maatregelen zouden kunnen bijdragen aan herstel en instandhouding van die soorten. De commissie constateert op grond daarvan dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een "CRO-projectaanvraag". De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4b uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De verschillende subdoelen zijn nog niet tot in detail bekend, maar zullen binnen de hoofddoelstelling vallen.
Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft helder beschreven aan welke voorwaarden een onderzoeksvraag dient te voldoen. Indien mogelijk worden onderzoeksvragen met betrekking tot dezelfde diersoorten gecombineerd, waardoor er minder dieren gebruikt hoeven worden. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over het al dan niet aannemen van opdrachten, 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. In deze aanvraag worden experimenten beschreven met diersoorten die beschermd zijn, waardoor deze niet gevangen en/of gedood mogen worden. In de Wet natuurbescherming wordt een uitzondering gemaakt indien het doel van de handelingen het behoud van de soort is. In dat geval kan een vergunning verleend worden om beschermde dieren te vangen. **10.2.e. eng** beschikt over de benodigde ontheffingen en vergunningen om beschermde kleine zoogdieren te vangen en eventueel te doden.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is meer kennis te verkrijgen, met behulp van telemetrisch onderzoek, over de habitats en het habitatgebruik van inheemse en uitheemse kleine zoogdiersoorten met als doel duurzame instandhouding, herstel en uitbreiding van in Nederland bedreigde inheemse kleine zoogdieren. Het uiteindelijke doel is bescherming van voor Nederland inheemse kleine zoogdieren met behulp van de met dit onderzoek achterhaalde sleutelfactoren voor adequatere bescherming op gebiedsniveau. De concrete onderzoeksvragen die bijdragen aan de genoemde kennis (directe doel) zijn nog niet tot in detail bekend omdat het gaat om onderzoek in opdracht van of in samenwerking met externe opdrachtgevers. Het is duidelijk dat de onderzoeksvragen zullen vallen binnen het directe doel van deze projectaanvraag, en dat die kennis zal bijdragen aan het uiteindelijke doel, namelijk het ontwikkelen van maatregelen die ten goede komen aan voor Nederland inheemse kleine zoogdieren. Er is daarom binnen deze

aanvraag een directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat belangrijke kennis van ecologische sleutelfactoren van bijvoorbeeld bepaalde vleermuissoorten en kleine marterachtigen nog zeer beperkt is, (zoals de overwinteringsplaatsen, de migratieafstanden naar voortplantingsgebieden, en het type habitat waarin kleine marterachtigen verblijven buiten de voortplantingsperiode), dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van goede beschermingsmaatregelen, en dat deze beschermingsmaatregelen bijdragen aan het voortbestaan van de soort en bovendien wettelijk vereist zijn in het kader van EU-wetgeving. Het onderzoek zelf is niet wettelijk vereist, maar genereert de kennis die nodig is om wettelijke vereiste maatregelen met een goede onderbouwing te kunnen nemen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de maatschappij.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren met een extern aangebrachte radiotransmitter zullen mogelijk in geringe mate beperkt worden in hun natuurlijke gedrag, en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de aanvrager (een zogenaamd "groen bureau") geldt dat deze een commercieel belang heeft bij het kunnen uitvoeren van opdrachten van derden. Op zichzelf vormt dit geen bezwaar, maar evenmin is het op zichzelf een goede reden om onderzoek uit te voeren. De aanvrager heeft duidelijk omschreven op basis van welke criteria hij een dergelijk opdracht zal accepteren. Overwegingen met betrekking tot de bescherming van diersoorten en de natuur dienen de belangrijkste drijfveer achter het onderzoek te zijn.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en opdrachten. Dit kan door de onderzoeker en de betrokken organisatie zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (natuurbescherming, kennis).

De diersoorten die in de experimenten gebruikt worden zijn ook de doeldiersoorten. Het onderzoek dient informatie op te leveren die gebruikt kan worden om goed onderbouwde beschermingsmaatregelen te nemen voor inheemse kleine zoogdiersoorten. Volgens de DEC kan gesteld worden dat deze dieren, in elk geval op populatieniveau, maar wellicht ook op het niveau van het individu, uiteindelijk zullen profiteren van de opbrengsten van dit onderzoek. Het is in dit geval zelfs niet uitgesloten dat ook individuele dieren die in de proef gebruikt worden zelf uiteindelijk nog profiteren van de beschermingsmaatregelen die worden genomen. De dieren worden immers niet gedood in het kader van de proef.

Voor de maatschappij is dit onderzoek van belang, omdat het kan leiden tot de instandhouding van belangrijke natuurwaarden, zoals het voortbestaan van bedreigde inheemse diersoorten (biodiversiteit). Instandhouding van soortenrijkdom wordt ondersteund door grote delen van de bevolking in Nederland en Europa, en Nederland heeft zich geconformeerd aan deze instandhouding volgens diverse internationale verdragen. Voor soorten die zijn opgenomen in de Habitatrictlijn bestaat een verplichting en verantwoordelijkheid voor het behouden van een gunstige staat van instandhouding van populaties. Het in stand houden van belangrijke natuurwaarden is ook zonder die wettelijke verplichting van belang voor de samenleving.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De onderzoekers doen er alles aan om deze effecten te minimaliseren, bijvoorbeeld door (dieren met) transmitters op te sporen voordat de batterij leeg is. Wanneer

het onderzoek aan bedreigde soorten betreft waarvan in enkele gevallen de populaties klein zijn, wordt na overleg met soortenexperts afgewogen hoeveel individuen verantwoord gebruikt kunnen worden voor telemetrisch onderzoek. Het voortbestaan (en zo mogelijk uitbreiding) van de soort is het uiteindelijke doel van dit onderzoek.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met onderzoek aan wilde dieren in hun biotoop. Het onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in wetenschappelijke tijdschriften, bijdragen aan standaardwerken, en beschermingsplannen. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van de in deze aanvraag beschreven dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan (zie C1 en C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - 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)

De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: Onderzoek naar habitatgebruik van (bedreigde) diersoorten is alleen zinvol indien dit plaatsvindt bij de doeldieren in hun natuurlijke omgeving. De afweging om geen anesthesie toe te passen bij vleermuizen komt voort uit het feit dat het bijkomen van anesthesie voor meer ongerief zorgt dan het subcutaan plaatsen van een transponder of het extern aanbrengen van een zender. Bovendien bestaat het risico dat door toedienen van anesthesie vleermuizen in torpor raken en hier zeer lastig uit komen en wellicht sterven. De DEC is het eens met deze onderbouwingen voor het gebruik van (bedreigde) dieren in het wild, en het achterwege laten van verdoving voor het subcutaan plaatsen van een transponder of het extern aanbrengen van een zender bij vleermuissoorten.
10. De (wilde) dieren worden niet gehuisvest. De dieren worden tot maximaal 24 uur geobserveerd onder zo natuurlijk mogelijke omstandigheden na het bijkomen uit een narcose. Als zij weer zelfredzaam zijn worden zij vrijgelaten.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd als licht voor 68% van de dieren en matig voor 32% van de dieren. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het vangen van de wilde dieren en het (invasief) zenderen al dan

niet onder anesthesie. Voor de vleermuizen leidt het onderzoek tot licht ongerief. Het ongerief voor de niet-vleermuissoorten is matig wanneer anesthesie noodzakelijk is voor het zenderen.

12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. Voor onderzoek naar leefwijze, migratie en habitatgebruik worden dieren uitgerust met een zender of transponder. Deze zijn zo ontwikkeld en worden zodanig aangebracht dat zij het natuurlijke gedrag zo min mogelijk beïnvloeden. Echter, enige verandering in het normale gedrag is niet uit te sluiten.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat een humaan eindpunt zal bereiken is naar verwachting zeer laag en op basis van eigen ervaring en gegevens uit de wetenschappelijke literatuur ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. Die zijn in overeenstemming met wat in het veldonderzoek gebruikelijk is. Wanneer een gewond of ziek dier wordt gevangen maken ter zake deskundige personen een inschatting of het dier voldoende herstelmogelijkheden heeft. Als die er niet zijn wordt het dier ter plekke geëuthanaseerd, om onnodig verder lijden te voorkomen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Proefdiervrije alternatieven voor habitatonderzoek (zoals cameravallen en batdetectors) leveren andersoortige informatie op dan telemetrie, en zijn daardoor geen goede vervanging van de dierproeven. Bovendien is bij zeer zeldzame soorten, soorten met een sterk verborgen leefwijze, of kleine populaties de trefkans met cameravallen en batdetectors ontoereikend. Voor het onderzoek beschreven in de projectaanvraag zijn dierproeven noodzakelijk.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Het betreft soms bedreigde soorten waarvan in enkele gevallen de populaties klein zijn (zoals zeldzame vleermuissoorten). In samenspraak met soortenexperts wordt afgewogen hoeveel individuen van een populatie verantwoord gebruikt kunnen worden voor het onderzoek, en of de resultaten dan nog wetenschappelijk betrouwbaar zijn.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Het personeel is bekwaam volgens het 'Vleermuis-vangststelsel' om vleermuizen te vangen, te hanteren en te zenderen met zo min mogelijk ongerief voor de dieren. De aanvrager beschikt over bevoegd en bekwaam personeel voor onderzoek met kleine zoogdieren, waarbij voor het implementeren van nieuwe vangstmethoden samenwerking wordt gezocht met ervaringsdeskundigen. De zenders worden met huidlijm of met een halsband / harnas aangebracht. Doorgaans vallen deze zenders binnen een half jaar vanzelf van het dier. Wanneer de zender niet op tijd vanzelf van het dier valt, wordt het dier teruggevangen en wordt de zender verwijderd. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren worden in het wild gevangen en niet gefokt.
19. De dieren worden niet gedood in het kader van het project.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen)

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het verkrijgen van meer kennis, met behulp van telemetrisch onderzoek, over de habitats en het habitatgebruik van inheemse en uitheemse soorten met als doel duurzame instandhouding, herstel en uitbreiding van in Nederland bedreigde inheemse kleine zoogdieren het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte (voor 68% van de dieren) of matige (voor 32% van de dieren) aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).
De diersoorten die in de experimenten gebruikt worden zijn ook de doeldiersoorten. Het onderzoek dient informatie op te leveren die gebruikt kan worden om goed onderbouwde beschermingsmaatregelen te nemen voor inheemse kleine zoogdiersoorten. Volgens de DEC kan gesteld worden dat deze dieren, in elk geval op populatieniveau, maar wellicht ook op het niveau van het individu, uiteindelijk zullen profiteren van de opbrengsten van dit onderzoek. Het is in dit geval zelfs niet uitgesloten dat ook individuele dieren die in de proef gebruikt worden zelf uiteindelijk nog profiteren van de beschermingsmaatregelen die worden genomen. De dieren worden immers niet gedood in het kader van de proef.
Voor de maatschappij is dit onderzoek van belang, omdat het kan leiden tot de instandhouding van belangrijke natuurwaarden, zoals het voortbestaan van bedreigde zoogdiersoorten. De DEC kent daar gewicht aan toe om de volgende redenen. Instandhouding van soortenrijkdom (biodiversiteit) wordt als een belangrijke waarde beschouwd door grote delen van de bevolking in Nederland en Europa. Bovendien heeft Nederland zich geconformeerd aan de instandhouding van biodiversiteit volgens diverse internationale verdragen. Voor soorten die zijn opgenomen in de Habitatrichtlijn bestaat een wettelijke verplichting en verantwoordelijkheid voor het behouden van een gunstige staat van instandhouding van populaties. Het in stand houden van belangrijke natuurwaarden is (ook zonder die wettelijke verplichting) van belang voor de samenleving.
De verkregen informatie is ook voor de internationale wetenschappelijke gemeenschap van belang, omdat het kennis oplevert over de ecologie van deze dieren. Mogelijk is die kennis ook bruikbaar voor het ontwerpen van onderzoek naar de bescherming van deze dieren in andere gebieden.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: meer kennis te verkrijgen, met behulp van telemetrisch onderzoek, over de habitats en het habitatgebruik van inheemse en uitheemse soorten met als doel duurzame instandhouding, herstel en uitbreiding van in Nederland bedreigde inheemse kleine zoogdieren. Het uiteindelijke doel is bescherming van voor Nederland inheemse kleine zoogdieren met behulp van de met dit onderzoek gevonden sleutelfactoren voor adequatere bescherming op gebiedsniveau. De DEC is van mening dat de belangen van de maatschappij en de in het wild levende dieren (populaties) voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De proefdiersoorten zijn in dit geval ook de doeldiersoorten. Het is in dit geval zelfs niet uitgesloten dat ook individuele dieren die in de proef gebruikt worden zelf uiteindelijk nog profiteren van de beschermingsmaatregelen die worden genomen. De dieren worden immers niet gedood in het kader van de proef. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Hoewel er sprake is van het gebruik van (bedreigde) dieren in het wild, en er in sommige gevallen geen verdoving of pijnbestrijding wordt toegepast, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden (zie C9).
- De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 10.2 .e. en g 20198964
Bijlagen
1

Datum 9 maart 2020
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 6 november 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Telemetrisch onderzoek aan wilde, kleine zoogdieren t.b.v. soortbescherming en -instandhouding" met aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 20198964. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 9 maart 2020 tot en met 1 maart 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie RU DEC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 30 januari 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager


Op 14 februari 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het benoemen van de te onderzoeken diersoorten in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Datum:

9 maart 2020

Aanvraagnummer:AVC  20198964**Bezwaar**

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

9 maart 2020

Aanvraagnummer:AVD  20198964

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2 .e. en g

deze projectvergunning voor het tijdvak 9 maart 2020 tot en met 1 maart 2025, voor het project "Telemetrisch onderzoek aan wilde, kleine zoogdieren t.b.v. soortbescherming en -instandhouding" met aanvraagnummer AVD^{10.2 .e. en g} 20198964, na advies van dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Project/Onderzoeker/ Instantie voor Dierenwelzijn.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 november 2019
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 30 januari 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Telemetrisch onderzoek, zoals ontvangen op 30 januari 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 18 februari 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 30 januari 2020
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 18 februari 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Telemetrisch onderzoek			
	Andere zoogdieren (andere Mammalia) / Vleermuizen (300) en kleine zoogdieren (200)	500	32,0% Matig 68,0% Licht

Voorschriften


Overige wet- en regelgeving blijft van kracht. U dient zorg te dragen voor de juiste ontheffingen en vergunningen voor het vangen en doden van (beschermd) kleine zoogdieren.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer:

AVD  20198964

- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD  20198964

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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 onvereenigbaar 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

Aanvraagnummer:AVD  20198964

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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).

Wilde dieren

Het vangen van wilde dieren moet volgens artikel 10f van de wet door een deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.



202010465

Centrale Commissie Dierproeven

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.	25.000
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Sovon Vogelonderzoek Nederland
1.3	Vul de titel van het project in.	Onderzoek aan de populatiedynamiek van in het wild levende vogels ten behoeve van beleid, beheer en wetenschap

2 Categorie van het project

2.1	In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de L o D v P h <input checked="" type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek <input type="checkbox"/> 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.

Achtergrond van de aanvraag

De CCD heeft op 20 juli 2016 besloten om de projectaanvraag van Sovon met de titel 'Populatiodynamisch onderzoek aan wilde vogels' AVD250002015200 goed te keuren, met een looptijd van het project van 20 juli 2016 tot 1 maart 2021. Sovon voert onder deze projectaanvraag verschillende studies uit. Ook na 1 maart 2021 is er bij Sovon de behoefte om in onderzoeksprojecten rondom de vraag van populatiodynamiek van in het wild levende vogels in voorkomende gevallen dierproeven uit te voeren. Dit omdat bepaalde onderzoeksvragen na grondige afweging onder begeleiding en goedkeuring van de Sovon IvD slechts door inzet van dierproeven beantwoord kunnen worden. In deze projectaanvraag lichten we deze onderzoeksvragen en de afwegingen toe en verwijzen we ook naar de studies die onder AVD250002015200 in de periode 07/2016 tot heden zijn uitgevoerd. Het gaat daarbij b.v. om studies aan Scholeksters (bloed prikken, zenderstudie; doel: in beeld brengen van cumulatieve effecten van verstoring op de in het Waddengebied onder druk staande populatie van de Scholekster), aan Kievit en Grutto (zenderstudie; doel: het in beeld brengen van de oorzaken van de achteruitgang van weidevogels in het agrarisch gebied, met name de overleving van jonge vogels en habitatgebruik van families in de jongenfase), aan Buizerd, Wespandief en Zeearend (zenderstudie; doel: het in beeld brengen van habitatgebruik en vliegpatronen, ook met oog op mogelijke aanvaringsrisico's met windturbines en hoogspanningslijnen, tevens rol van deze vogels als mogelijke vectoren voor dierziektes), aan Grauwe Ganzen (zenderstudie; doel: het in beeld brengen van habitatgebruik in relatie tot landbouwschade, dit in het kader van de beoordeling van de effectiviteit van verjagingsmaatregelen om landbouwschade te beperken) en Zwarte Spechten (zenderstudie, nekbandjes bij nestjonge vogels; doel: het in beeld brengen van het dieet in de nestfase, het habitatgebruik in relatie tot voedselbeschikbaarheid, dit in het kader van natuurbeheervragen en gestelde instandhoudingsdoelen binnen Natura 2000) en aan meeuwen (zenderstudie; doel: het in beeld brengen van foerageerlocaties op zee in relatie tot (zoek)gebieden voor windenergie op zee).

Sovon

Sovon Vogelonderzoek Nederland is een door projecten gefinancierde kennisorganisatie met de structuur van een vereniging. Onze vereniging organiseert jaarrond landelijke tellingen van in het wild levende vogels om veranderingen in aantallen en verspreiding te signaleren (monitoring). Om deze veranderingen te kunnen verklaren voert Sovon daarnaast bureau- en veldonderzoek uit voor diverse opdrachtgevers waaronder Rijk, provincies, terreinbeheerders, particuliere fondsen en bedrijven. Met deze onderzoeken verzamelen we gegevens waarmee de demografische parameters van wilde vogelpopulaties, te weten reproductie, sterfte, immigratie en emigratie, kunnen worden geschat. Met deze schattingen begrijpen we de populatiodynamica van vogels beter, maar kunnen we ook de invloed van omgevingsfactoren op populaties in beeld brengen. Dat is het alomvattende onderzoeksthema van Sovon: in beeld brengen wat de populatiodynamica van in het wild levende vogels is en begrijpen welke factoren daarbij een rol spelen. Deze kennis stelt Sovon beschikbaar in onderzoeksprojecten die zij in opdracht van derde partijen uitvoert, vaak tevens in samenwerking met andere kennisorganisaties of groene bureaus. Als een volledig project-gedreven kennisorganisatie speelt Sovon in op de vragen met betrekking tot wilde vogels die in onze samenleving spelen. De gegevens worden primair verzameld in het kader van toegepast onderzoek, maar zijn vaak ook fundamenteel wetenschappelijk van belang. De scope van onderzoeksprojecten die Sovon uitvoert is breed maar blijft binnen de kaders die door de Sovon Meerjarenvisies (over periodes van 4 jaar) worden vastgelegd door Sovon bestuur en ledenraad. <https://www.sovon.nl/nl/content/beleid>
Hierbij wordt het bestuur en het bureau geadviseerd door een Wetenschappelijke Begeleidingscommissie WBC. <https://www.sovon.nl/wetenschap>

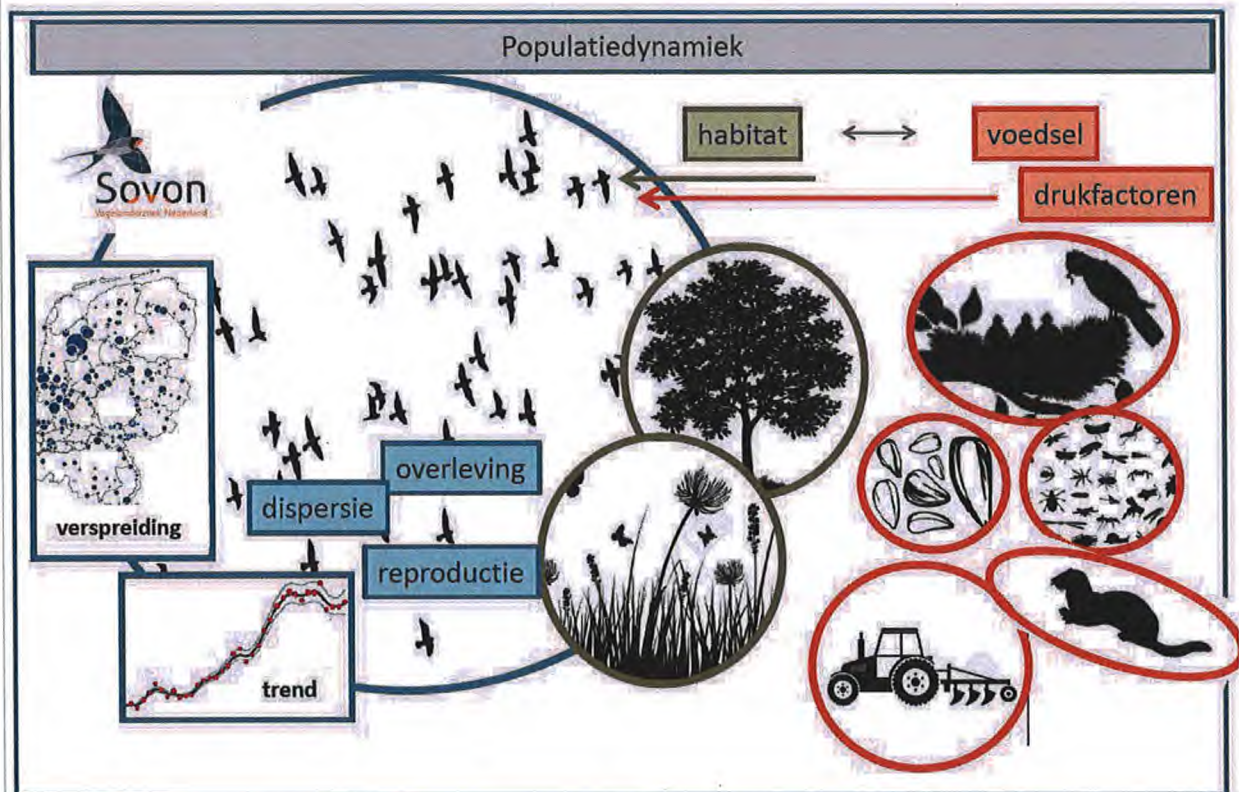
Onderzoek aan de populatiodynamiek van in het wild levende vogels-

Voor populatiodynamisch onderzoek aan in het wild levende vogels is het nodig om dierproeven uit te voeren om de onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden. Het gaat hierbij om het gebruik van zenders, het nemen van bloedmonsters en het aanbrengen van nekbandjes bij nestjonge vogels voor voedselonderzoek. Ook kunnen enkele lichaamsveren worden getrokken voor b.v. isotopen analyses of swabs (keel & cloaca) worden genomen voor b.v. vogelgrieponderzoek, beide handelingen worden formeel niet als dierproef gezien conform de Handreiking 'Dierproeven met wilde dieren in hun biotoop' (CCD 2018).

Om deze proeven te kunnen uitvoeren moet een individuele vogel worden gevangen; de vangmethode is als zodanig geen dierproef maar wanneer een vervolghandeling met een gevangen vogel wordt uitgevoerd wordt de vangst onderdeel van de dierproef en moeten handelingen tijdens de vangst meegewogen worden bij de bepaling van het ongerief. Als deze verschillende handelingen bij eenzelfde

soort aan de orde zijn, wordt er altijd naar gestreefd om deze verschillende handelingen zoveel mogelijk te combineren bij hetzelfde individu, waardoor het totaal aantal individuen dat hieraan wordt onderworpen kan worden beperkt. Ook vindt tussen onderzoeksinstituten binnen Nederland goede afstemming plaats, waardoor het aantal vogels dat aan handelingen wordt onderworpen zo beperkt mogelijk blijft.

Het onderzoek van Sovon waarin bovengenoemde methoden worden toegepast heeft het omvattende thema *Kennisvermeerdering van de populatiedynamiek van in het wild levende vogels*. Dit thema-omvat vragen ten behoeve van het terreingebruik door vogels, hun voedselkeuze, individuele conditie, invloed van predatoren en ziektes om zo een relatie te kunnen leggen met reproductie, dispersie en overleving (Figuur 1).



Figuur 1: Schematisch overzicht van factoren die van invloed kunnen zijn op de populatiedynamiek van in het wild levende vogels, welke de uitkomsten van monitoring (trends en verspreiding) kunnen helpen verklaren.

Maatschappelijke inbedding van het onderzoek

Alle vogels die van nature in het wild voorkomen in Nederland zijn beschermd onder de Wet Natuurbescherming. Nederland heeft een internationale verplichting voor actieve bescherming van soorten, welke voortkomt uit de Habitatrictlijn, de Vogelrichtlijn en de Verdragen van Bern en Bonn. In het Natuurbestuur, waarin de afspraken tussen Rijk en provincies over het natuurbeleid zijn vastgelegd, is afgesproken dat de (inter-)nationale verplichtingen en biodiversiteitsdoelen samen met de Rode Lijsten leidend zijn in de inspanningen op het gebied van actieve soortenbescherming. Met actieve soortenbescherming wordt bedoeld maatregelen ter bescherming of stimulering van meerdere soorten (leefgebiedenbenadering) met als doel de natuurkwaliteit in bepaalde gebieden te verbeteren dan wel maatregelen ter bescherming van één soort. Alle gebieden die in Nederland zijn aangewezen onder de Habitat- en Vogelrichtlijn vallen onder het Natura 2000-netwerk. Voor elk Natura 2000-gebied zijn instandhoudingsdoelstellingen opgenomen. Met zo'n doelstelling wordt duidelijk hoeveel geschikt leefgebied er beschikbaar moet blijven, of hersteld moet worden, voor de soorten waarvoor het gebied is aangewezen.

Om leefgebieden binnen Nederland optimaal te kunnen inrichten voor beschermde vogelsoorten hebben

(terrein-)beheerders behoefte aan kennis over hoe een soort een gebied gebruikt: waar liggen de foerageergebieden, wat zijn goede nestlocaties en waar zijn de slaapplekken? En belangrijk, wat zijn de kenmerken van deze locaties? Met deze kennis kunnen terreinen optimaal worden ingericht ten behoeve van een verbeterde bescherming van de soort. Het kan hierbij gaan om vogels die in Nederland broeden en in de winter wegtrekken, standvogels die jaarrond hun leefgebied in ons land hebben, of vogels die bij ons overwinteren en elders broeden. (Terrein-)beheerders kunnen ook te maken hebben met conflicterende Natura 2000-doelen. Zo kan er voor een gebied een doel zijn geformuleerd voor een bepaald habitattype terwijl een bepaalde vogelsoort met andere habitateisen ook als doelsoort is aangewezen voor hetzelfde gebied. In deze gevallen is er behoefte aan kennis over het terreingebruik van vogelsoorten om te bepalen wat het effect is van het verdwijnen van een deel van hun leefgebied, evenals kennis over in hoeverre er een kwaliteitsimpuls kan worden gegeven aan het resterende leefgebied voor de betreffende vogelsoort.

Veel vogels zijn trekvogels, en verblijven maar een deel van het jaar in ons land. Naast kennis over het leefgebied binnen Nederland is het begrijpen van de processen die zich afspelen gedurende de gehele jaarcyclus van groot belang. Deze informatie is belangrijk omdat trekvogels alleen gebaat zijn bij een jaarrond bescherming; een goede bescherming in Nederland werkt niet optimaal als dezelfde populatie in het buitenland zwaar wordt bedreigd.

Wilde vogels zijn zeer mobiel. Dit maakt het moeilijk het gedrag van individuele vogels over een langere tijdsperiode te bestuderen. Onderzoek aan geringde vogels maakt een individuele herkenning mogelijk maar kent de beperking van de ruimtelijke fluctuaties in ringdichtheden en afleeskansen. Zenders en loggers bieden hierbij uitkomst. Voor zowel het in beeld brengen van lokale als grensoverschrijdende bewegingen van vogels zijn zenders en loggers een onontbeerlijk instrument geworden. Er zijn twee voorname redenen om een vogel uit te rusten met een zender of logger. Ten eerste kun je zo het lokale terrein- en habitatgebruik in kaart brengen. Hoe groot is de home range, en welke plekken daarbinnen worden meer of minder vaak bezocht? Welke habitats worden geprefereerd of juist ontweken? Informatie hierover geeft inzicht in de ecologie van de soort. Het laat zien welke elementen in het landschap belangrijk zijn voor de soort, waarmee terrein- en habitatstudies van grote waarde kunnen zijn voor soortbescherming. Een tweede belangrijke toepassing van zenders of loggers is onderzoek naar dispersie en vogeltrek. Hoe verspreiden jonge vogels zich na het uitvliegen en waar vestigen ze zich als broedvogel? Welke routes volgen trekvogels, waar stoppen ze onderweg om energievoorraden aan te vullen en waar overwinteren ze? Zulke kennis is essentieel om een beeld te krijgen van het leven van een vogel gedurende de hele jaarcyclus.

De fitness of gezondheid van een vogelpopulatie is een belangrijke graadmeter voor beheer van soorten en leefgebieden. In het drukbevolkte en -gebruikte Nederland staan populaties van wilde vogels voortdurend bloot aan allerlei invloeden. De fitness van een populatie wordt bepaald door de fitness van de individuen (in hoeverre is een individu in staat bij te dragen aan de volgende generatie). Door bij een random steekproef van individuen een bloedmonster af te nemen om de conditie te bepalen kan inzicht worden verkregen in het welzijn van de vogelpopulatie. Fenotypische en genetische variatie tussen individuen veroorzaakt variatie in de reactie op de omgeving binnen een populatie wat zich kan uiten in veranderingen in reproductie, sterfte en migratie. Daarnaast kunnen verschillen in de conditie van een individu leiden tot verschillende reacties op veranderingen in hun leefomgeving. Deze processen bepalen de veerkracht van een populatie en verklaren afname, stabilisatie of toename van aantallen en/of verspreiding zoals we die via de monitoringprojecten landelijk en regionaal in beeld brengen.

Inzicht in de dieetsamenstelling vormt een essentieel onderdeel van de ecologische basiskennis van een vogelsoort. Kennis over voedselkeuzes kan informatie geven over de eisen waar het leefgebied aan zou moeten voldoen om in de voedselbehoefte te kunnen voorzien. Veranderingen in het voedselaanbod kunnen ook een verklaring zijn voor de toe- of afname van bepaalde soorten.

Voor diverse soorten is de dieetsamenstelling niet goed vast te stellen met alleen observaties (al dan niet met behulp van camera's) of het analyseren van uitwerpselen of braakballen. Prooidiersoorten kunnen zo klein zijn dat ze niet goed waarneembaar zijn. Als gevolg van grote verschillen in verteerbaarheid tussen prooidiersoorten geeft analyse van uitwerpselen en braakballen in veel gevallen een onvoldoende beeld van de dieetsamenstelling. Maagonderzoek aan vogels die een natuurlijke dood gestorven zijn is vaak niet mogelijk, aangezien deze weinig worden gevonden. In specifieke gevallen kan een nekbandje uitkomst bieden, waardoor bij nestjongen het voedsel niet doorgeslikt kan worden wat vervolgens

verzameld wordt voor dieetonderzoek.

Met behulp van analyses van weefselmonsters, zoals veren en bloed (isotopenanalyse), kan ook inzicht worden verkregen in de dieet- en habitatkeuze van vogels. Isotopenanalyse geeft dus ook informatie over de foerageerlocatie.

Algemene overwegingen voor deze projectaanvraag

Als een onderzoeksproject onder de Wet op de Dierproeven valt moet daar een projectvergunning voor worden aangevraagd. Het tijdspad en de financiële lasten die met het aanvragen van een projectvergunning voor met name kleinere projecten gepaard gaan, dreigen te resulteren in een situatie waarbij dit soort onderzoek niet meer kan worden uitgevoerd.

Gezien het grote belang dat beheers- en beschermingsmaatregelen wetenschappelijk onderbouwd worden is besloten dit onderzoek onder te brengen in een op hoger aggregatie niveau beschreven project. Dit project heeft als **doelstelling**: "Een beter inzicht in de populatiedynamica van in het wild levende vogels via schattingen van demografische parameters, welke bijdragen aan het opstellen van soortgerichte beheer- en beschermingsmaatregelen, en het inschatten van effecten van veranderingen in of nabij leefgebieden". Deze stap is ingegeven door de overtuiging dat ook dit hogere aggregatie niveau leidt tot een toetsbare eenheid. De belangrijkste overwegingen hierbij zijn

- een dierproef is in alle gevallen goed en herleidbaar te beschrijven op een hoger aggregatie niveau;
- de gevolgen van de handelingen voor gezondheid, welzijn en integriteit zijn ongeacht de soort en het type leefgebied goed voorspelbaar;
- er kan een vergelijkbaar oordeel over de aan- of afwezigheid van reële alternatieven worden gegeven.

Het ongerief wordt bij alle soorten vooral bepaald door de handelingen voorafgaand aan de feitelijke dierproef, namelijk het vangen en fixeren. De vangmethodes verschillen per soortgroep (Tabel 1 voor het overzicht van de vangmethoden). Het vangen van de vogels zorgt voor ongerief dat we doorgaans als licht tot matig inschatten. Vanuit het voorzichtigheidsprincipe schatten we het ongerief dat voor het proefdier door de vangst en het bijbehorende hanteren wordt veroorzaakt doorgaans als matig in. Het uitvoeren van de experimentele handelingen zelf (het aanbrengen van zender/ logger, nemen van bloedmonsters en het aanbrengen van nekbandjes voor voedselonderzoek) leidt in alle gevallen tot goed voorspelbaar ongerief (Tabel 2), afhankelijk van de voorziene handeling is het ongerief licht of matig.

Tabel 1. Overzicht van vangstmethodieken per soortgroep. Niet alle vangmethoden zijn van toepassing bij alle soortgroepen.

vangstmethodiek	mistnet	kanonnet	vangfuik	vangst op nest	klapnet en lokvogel
ganzen, zwanen en eenden	nvt	x	x	x	x
reigers en rallen	nvt	x	nvt	x	nvt
meeuwen en sterns	x	x	nvt	x	x
uilen en roofvogels	x	nvt	nvt	x	x
grote zangvogels (lijsters en kraaiachtigen)	x	nvt	nvt	x	x
kleine zangvogels (mezen, vinken, zangers)	x	nvt	nvt	x	nvt
spechten en parkieten	x	nvt	nvt	x	nvt
nachtzwaluwen en gierzwaluwen	x	nvt	nvt	x	nvt
hoenders	nvt	x	nvt	x	x
steltlopers	x	x	nvt	x	x

In tabel 2 wordt het aantal proefdieren per type dierproef weergegeven, met daarbij de mate van ongerief. De aantallen worden onderbouwd in de bijlagen. Deze aantallen moeten worden beschouwd als een bovengrens en dus als kader voor deze vergunningaanvraag. De motivatie van de aantallen komt voort uit de ervaringen in de periode 2016-2020 (AVD250002015200) (zie ook tabel 2) in combinatie met de voorziene ontwikkeling van de inzet van bepaalde technieken voor de beantwoording van onderzoeksvragen. Bij de inzet van zendertechnologie ter beantwoording van onderzoeksvragen voorzien we een toename: de kwaliteit van de zenders en technologie van datatransmissie is sterk verbeterd, zenders worden kleiner en lichter, batterijen gaan langer mee en bieden randvoorwaarden om data over een langere periode te verzamelen, de technologieën voor datatransmissie zijn radicaal aan het veranderen, zodat de afweging tussen de inzet van zenders en dus de uitvoering van een dierproef en de mate van ongerief evenals de mogelijkheid om met alternatieve technieken vergelijkbare data te verzamelen steeds vaker ten gunste van de inzet van een zender wordt gemaakt. Met deze ontwikkeling

hebben we rekening gehouden bij de bepaling van de maximale aantallen proefdieren per categorie. Sovon zal aan de IvD voorleggen wanneer een studie van start gaat waarbij dierproeven zoals in deze aanvraag beschreven aan de orde zullen zijn.

Tabel 2. *Mate van ongerief voor de 3 in dit project beschreven handelingen die vallen onder de WoD, tevens maximum aantal proefdieren tijdens de 5 jarige looptijd van het project. Kleurcode ongerief: rood = matig ongerief, groen = licht ongerief. Tevens is ter vergelijking het aantal proefdieren per categorie weergegeven dat binnen werkprotocollen onder het Sovon project AVD250002015200 in de periode tot 06/2020 is ingezet.*

	Bloedmonster	Zender in combinatie met bloedmonster	Nekbandje
	<i>Bijlage 1</i>	<i>Bijlage 2</i>	<i>Bijlage 3</i>
Aantal gevraagd voor periode 2021-2025	2000	2500	120
Ter vergelijking: max. aantal in periode 2016-2020 (tussen haakjes gerealiseerd aantal stand sept. 2020) onder AVD250002015200	2000 (1900)	1150 (1050)	120 (96)

De totale mate van ongerief is een cumulatieve waarde van de vangstmethode (die feitelijk geen dierproef is) en de experimentele procedure. Het gaat om een cumulatie van het ingeschatte ongerief dat voortkomt uit vangst en hanteren van het dier, door ons uit voorzichtigheidsprincipe ingeschat als matig ongerief en het ongerief dat voortkomt uit de onder de WoD vallende handeling (Tabel 2). De cumulatieve waarde van het ongerief dat voortkomt uit beide onderdelen van de proef wordt als matig ongerief beoordeelt. Belangrijke kanttekening is dat dieren die voor handelingen onder bijlage 1 en deels ook voor handelingen onder bijlage 2 worden gevangen in veel voorkomende gevallen sowieso ten behoeven van het aanbrengen van ringen zullen worden gevangen en gehanteerd. Deze handelingen vallen niet onder de WoD maar veroorzaken ook ongerief. Voor deze dieren in het aanvullende ongerief door de proefdierhandeling zeer beperkt (zie kleurcode in tabel 2) ook komt de beoordeling van het ongerief als cumulatieve waarde uit op de categorie 'matig'. Het hier beschreven project heeft betrekking op in totaal 4620 proefdieren (bovengrens), waarbij het in alle gevallen om matig ongerief gaat.

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?
- I. Het onderzoeksdoel van dit project is: Een verbeterd inzicht in populatiedynamica van in het wild levende vogelsoorten via schattingen van demografische parameters, waardoor deze beter kunnen worden beschermd en beheerd, en het effect van veranderingen (positief/negatief) in of nabij leefgebieden kan worden ingeschat. Binnen dit doel kunnen de volgende onderzoeksvragen worden gesteld:
1. Wat is het terreingebruik van een vogelsoort op bepaalde locaties?
 2. Wat is de dieetsamenstelling van een vogelsoort en wat zijn de consequenties van dieetsamenstelling voor de reproductie en overleving?
 3. Wat is de conditie van vogels van een soort op bepaalde locaties en wat zijn de consequenties voor reproductie en overleving?

4. Wat is de dispersieafstand van jonge vogels en waar gaan ze naartoe? Hoe honkvast zijn adulte broedvogels, komen ze in navolgende jaren terug naar dezelfde broedlocatie?
5. Welke routes vliegen onze trekvogels, waar stoppen ze onderweg om energievoorraden aan te vullen en waar overwinteren ze?

De beantwoording van bovenstaande vragen kan uiteindelijk leiden tot beantwoording van de volgende toegepaste onderzoeksvragen, die b.v. vanuit het natuurbeheer of vanuit een beschermingsperspectief worden gesteld:

- A. Welke beheermaatregelen kunnen in het leefgebied worden genomen om de kwaliteit daarvan te verhogen om zodoende de populatie beter te kunnen beschermen, c.q. beheren?
- B. Welke maatregelen kunnen in bestaand leefgebied van een vogelsoort worden getroffen zodat het voedselaanbod en de overlevingskans kan worden verhoogd?
- C. Wat is de effectiviteit van genomen beschermings- en/of beheermaatregelen op de vogelpopulatie en indien deze onvoldoende is, hoe kan dat worden verbeterd?

Sovon heeft de deskundigheid, expertise en infrastructuur in huis om de in deze aanvraag beschreven typen onderzoek goed uit te voeren:

- De algemene kwaliteit van ons (veld)onderzoek wordt beoordeeld door onze Wetenschappelijke Begeleidingscommissie.
- We maken voor ons onderzoek gebruik van de nieuwste technieken en laatste wetenschappelijke inzichten, en investeren via cursussen, trainingen en workshops gericht in kennisontwikkeling van ons personeel.
- De inhoudelijke kwaliteit van onze projecten wordt gewaarborgd door een systeem van projectbegeleiders, in de regel (gepromoveerde) senior-onderzoekers.
- De resultaten worden vastgelegd in rapporten en (peer reviewed) artikelen. De rapporten van onze vereniging zijn vrij beschikbaar via onze website.
- We hebben ons verbonden aan de centrale principes uit de Nederlandse Gedragscode voor Wetenschapsbeoefening: zorgvuldigheid, betrouwbaarheid, controleerbaarheid, onpartijdigheid en onafhankelijkheid.
- Bovenstaande hebben we verankerd in onze interne processen voor het ontwikkelen en uitvoeren van projecten. Hiervoor hebben we een kwaliteitsmanagementsysteem dat gecertificeerd is volgens de ISO-9001:2015 norm.

3.3 Belang

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

Maatschappelijk belang

- Bescherming en beheer. Veel vogelsoorten in Nederland zijn in meer of mindere mate bedreigd, waardoor het noodzakelijk is om de kennis ten behoeve van bescherming en beheer, die vanuit diverse nationale en internationale wetgevingen verplicht is, te optimaliseren. Voor het opstellen van effectieve(re) beschermingsmaatregelen is kennis over de populatiedynamica van de soort, waaronder de genetische diversiteit en de fitness, essentieel. De door ons uitgevoerde projecten vergaren kennis over factoren die van belang zijn voor het voorkomen van een soort op een bepaalde plek. Door die omstandigheden te verbeteren of juist te verslechteren door beheersmaatregelen kan sturing worden aangebracht in de populatieomvang op een bepaalde locatie.
- Vogels worden door een groot deel van onze samenleving als maatgevend gezien voor de kwaliteit van onze leefomgeving. Verbreiding van onze kennis over vogels draagt daaraan bij.

Wetenschappelijk belang:

- Fundamenteel onderzoek
Naast een belangrijke bijdrage voor effectievere bescherming leveren de projecten verbeterde kennis op over de ecologie van vogelsoorten en daarmee een bijdrage aan onze fundamentele kennis over de betreffende soort.

Voorbeeldprojecten met een bijdrage van Sovon

- Allen A.M., Ens B.J., van de Pol M., van der Jeugd H., Frauendorf M., Oosterbeek K. & Jongejans E. 2019. Seasonal survival and migratory connectivity of oystercatchers revealed by citizen science. The Auk: Ornithological Advances 136(1):1-17.
- Van den Bremer L., van Harxen R. & Stroeken P. 2009. Terreingebruik en voedselkeus van broedende Steenuilen in de Achterhoek. Sovon-rapport 2009/02. Sovon, Beek-Ubbergen.
- Ens B.J., Bom R.A., Dokter A.M., Oosterbeek K., de Jong J. & Bouten W. 2014. Nieuwe ontdekkingen en mogelijkheden in onderzoek aan Scholeksters dankzij het UvA Bird Tracking Systeem. Limosa 87: 117-128.
- Ens B.J., Bom R.A., Dokter A.M., Oosterbeek K., de Jong J. & Bouten W. 2014. Nieuwe ontdekkingen en mogelijkheden in onderzoek aan Scholeksters dankzij het UvA Bird Tracking Systeem. Limosa 87: 117-128.
- van Kleunen A., van Manen W., Nijssen M. & van den Burg A. 2020. Terreingebruik en voedsel van de Zwarte Specht in Noord-Brabant en Drenthe. Sovon-rapport 2020/15. Sovon Vogelonderzoek Nederland, Nijmegen.
- Van Kleunen A., Sierdsema H., Nijssen M., Huigens T., Wiersma P. & Wouters P. Ecologische monitoring van de Nachtzwaluw in Noord-Brabant in 2008-2010. Sovon-rapport 2012/43. Sovon Vogelonderzoek Nederland, Nijmegen.
- Linssen, H., Pol, M., Allen, A. M., Jans, M., Ens, B. J., Krijgsveld, K. L., Frauendorf, M., Kolk, H.-J., Disturbance Increases High Tide Travel Distance of a Roosting Shorebird but Only Marginally Affects Daily Energy Expenditure. Avian Research 2019, 10 (1), 1–11.
- Van Manen W., van Diermen J., van Rijn S. & van Geneijgen P., 2011. Ecologie van de Wespandief *Pernis apivorus* op de Veluwe in 2008-2010, populatie, broedbiologie, habitatgebruik en voedsel. Natura 2000 rapport, Provincie Gelderland, Arnhem NL
- Polwijk F., Kleefstra R., van Winden E. & Ens B.J. 2018. Monitoring van verstoringsbronnen en verstoringen als onderdeel van hoogwatertellingen in de Waddenzee. Limosa 91: 131-143.
- Roodbergen M., Nienhuis J. & Majoor F. 2011. Habitatvoorkeur van broedende Ooievaars in de IJsselvallei. SOVON-onderzoeksrapport 2011/16. SOVON Vogelonderzoek Nederland, Nijmegen.
- Roodbergen M., Schekkerman H., Teunissen W.A. & Oosterveld E. De invloed van beheer en predatie op de overleving van weidevogelkuikens in Friesland. SOVON-onderzoeksrapport 2010/12. A&W rapport 1510. SOVON Vogelonderzoek Nederland, Nijmegen.
- Schekkerman, H., W. Teunissen & E. Oosterveld 2009. Mortality of Black-tailed Godwit *Limosa limosa* and Northern Lapwing *Vanellus vanellus* chicks in wet grasslands: influence of predation and agriculture.. J. Ornithology 150: 133-145.
- Teunissen, W. A., H. Schekkerman, F. Willems, and F. Majoor. 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.
- van Turnhout C., Enters A., van Nee W. & Nienhuis J. 2017. Trends in broedprestaties van Nederlandse Ooievaars. Limosa 90: 178-185.
- Verhulst S., Oosterbeek K., Rutten A.L. en Ens B.J. 2004. Shellfish fishery severely reduces condition and survival of oystercatchers despite creation of large marine protected areas. Ecology and Society 9 (1): 17. <http://www.ecologyandsociety.org/vol9/iss1/art17/>

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Vooronderzoek

- Allereerst wordt voor elke onderzoeksvraag die betrekking kan hebben op één soort of een groep van soorten via literatuuronderzoek en consultatie van collega-onderzoekers achterhaald wat er reeds bekend is, en of dit niet al in voldoende mate de onderzoeksvragen beantwoordt voor het betreffende gebied. Op basis van deze informatie wordt besloten om tot een dierproef over te gaan. Hiertoe zal een onderzoeksplan worden opgesteld dat voorgelegd zal worden aan de IvD. De IvD zal bekijken of het onderzoeksplan, uitvoering van de experimenten en de ongeriefconsequenties passen binnen de kaders van dit project, en of alle mogelijke alternatieven zijn overwogen.
- Wanneer een dierproef nog niet eerder op de doelsoort of een verwante soort is uitgevoerd zal de haalbaarheid in de vorm van een pilot op kleine schaal worden getest. Indien wenselijk kan dit zoveel mogelijk in een gecontroleerde omgeving gedaan, waarbij de vogel(s) dus korte tijd in

gevangenschap worden gehouden. Met sommige wilde vogels zal dit echter in een aantal gevallen niet mogelijk zijn. De resultaten uit de pilot worden samen met de IvD beoordeelt zodat het uitvoeringstraject op zorgvuldige wijze geborgd is.

Brede context

De dierproeven zoals beschreven in dit projectvoorstel zijn bijna altijd onderdeel van een breder opgezet onderzoek om de beoogde doelstelling (zie 3.2) te kunnen halen. Veel van dit veldonderzoek valt buiten de kaders van de WoD maar draagt wel bij aan de beschreven doelstellingen. Hierbij kan gedacht worden aan het uitvoeren van tellingen, gedragsobservaties en onderzoek naar voedselaanbod. Zo worden bij (effect)studies naar terreingebruik met behulp van zenders de peillocaties naderhand bezocht om ze te beschrijven en zo te achterhalen wat de kenmerken zijn van plekken die voor de gevolgde vogel van belang zijn. In aanvulling hierop zullen ook met regelmaat, indien mogelijk, observaties op die plekken worden verricht om vast te stellen welke functie zo'n plek voor de vogel vervult.

Indien mogelijk wordt altijd aangesloten op reeds lopende projecten waarbij vogels worden gevangen (denk aan ringonderzoek Vogeltrekstation), zodat het aantal te vangen vogels zoveel mogelijk beperkt wordt (zie ook 3.4.3). In deze gevallen voegt de dierproef weinig toe aan het ongerief, aangezien het vangen voor het meeste ongerief zorgt (cumulatief ongerief is matig, zie bijlagen).

Het komt vaak voor dat onderzoek naar vogels op een bepaalde locatie parallel verloopt aan door derden uitgevoerd biologisch onderzoek (b.v. aan andere soortgroepen, vegetatie, bodem en water). De resultaten hiervan kunnen een belangrijke toegevoegde waarde vormen voor de resultaten van de in dit project beschreven dierproeven.

Dataverwerking, analyse en rapportage vormen onderdeel van elk project. In sommige gevallen zal dit door andere organisaties uitgevoerd worden, zoals b.v. de analyse van bloedmonsters, waarbij de resultaten worden meegenomen in een grootschalig onderzoek naar het voorkomen van virussen onder wilde vogels.

Aan het einde van de onderzoeksperiode wordt er altijd naar gestreefd de resultaten te publiceren in een wetenschappelijk tijdschrift. Echter, alle onderzoeksresultaten worden in de vorm van projectrapportages gepubliceerd op de onze website en zijn daar vrij toegankelijk.

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

Hieronder geven we puntsgewijs een samenvatting van de verschillende typen experimenten, waarbij wordt verwezen naar de bijlagen bij 3.4.4.

Algemeen

Voor alle dierproeven geldt dat vogels worden gevangen met een voor de betreffende soort en periode toegelaten en beproefde vangmethode, waarbij een minimaal risico op letsel van de vogel aanwezig is. Dit vangen gebeurt altijd door mensen die getraind zijn in de betreffende vangmethode en het hanteren van de betreffende soort(en) en welke beschikken over een ringvergunning uitgegeven door de Nederlandse Ringcentrale. Nadat de vogel is gevangen wordt het individu altijd eerst geringd, gewogen en gemeten. Het vangen en het bepalen van morfologische gegevens gebeurt volgens de richtlijnen en voorwaarden in de Ringvergunning van de Nederlandse Ringcentrale. Deze gegevens worden aangeleverd aan de Ringcentrale. Na het uitvoeren van de metingen en de dierproef wordt de vogel bij de vangplek vrijgelaten. De maximale duur tussen vangen en vrijlaten zal 1 uur zijn, maar over het algemeen veel korter.

De verdieping van de methodekennis die de verschillende studies opleveren zorgt doorlopend voor verfijning van de toepassing in toekomstig onderzoek.

Het prikken van bloed van een vogel (bijlage 3.4.4.1)

- Bij een vogel wordt eenmalig een bloedmonster afgenomen, welke capillair (bij grotere vogels met een injectiespuit) wordt verzameld door aanprikken van de vene aan de onderkant van de vleugel of aan de poot. Het monster betreft niet meer dan 0,5% van het lichaamsgewicht, maar meestal veel minder (enkele druppels).

Het met een zender/logger uitrusten van een vogel in combinatie met het prikken van bloed (bijlage 3.4.4.2)

- Vogels worden uitgerust met een zender of logger. Het formele onderscheid tussen een zender of een logger is voor de beoordeling onder de WoD arbitrair. Beiden worden op het dier bevestigd door middel van een tuigje of door plakken op veren of op de huid (veelal bij kuikens). We spreken van een zender op het moment dat de gegevens *real time* (of met enige vertraging als data pakketjes) worden verzonden naar de onderzoeker/worden ontvangen door de onderzoeker (via GSM, satelliet, ontvanger in het veld). Voor het uitlezen van datapakketten die door een logger zijn opgeslagen moet het dier terug worden gevangen of op korte afstand worden benaderd. De afbakening tussen zender en logger heeft geen consequenties voor de beoordeling van het ongerief.
- De zender/logger weegt niet meer dan 3% van het lichaamsgewicht. Wanneer er geen ervaring is met het gebruik van een zender/logger op een soort wordt altijd eerst een pilot uitgevoerd, al dan niet in een gecontroleerde omgeving (zie 3.4.1).
- Binnen de 5-jarige looptijd van het project zal het gebruik van de (nieuwste) zendertechniek altijd in het belang van een reductie van ongerief worden beoordeeld en keuzes voor zendertypes zo nodig worden bijgesteld. Deze afwegingen gebeuren in nauw overleg met de IvD.
- Voor iedere studie wordt in de voorbereidingsfase nauwkeurig gezocht naar de best passende combinatie van het zendertype en de vogelsoort.
- Alleen gezonde vogels in goede conditie krijgen een zender/logger. De conditie wordt bepaald op basis van het gewicht, uiterlijk en gedrag.
- De zender/logger wordt bevestigd op een manier die past bij de soort vogel en zender. Er wordt gestreefd naar een bevestigingsmethode waarbij de zender/logger aan het einde van de onderzoeksperiode vanzelf afvalt (gebruik van een zogeheten "breekpunt" in het tuigje). Wanneer dit door omstandigheden niet mogelijk is, wordt gestreefd vogels terug te vangen om de zender/logger te verwijderen, wat bij een veelvoud aan soorten geen probleem is (kolonie dieren, nestkast bewoners etc). Echter, onze ervaring leert dat er ook veel situaties zijn waarin het niet mogelijk is om een vogel met zender/logger terug te vangen en waarbij in de beoordeling van het studieprotocol door de IvD moet worden afgewogen of de proef toelaatbaar is vanwege het niet kunnen verwijderen van de zender/logger.
- Afhankelijk van het type zender wordt de data in het veld verzameld (zoals peilingen van radiozenders) of op afstand met regelmaat uitgelezen (b.v. GPS-dataloggers). Bij satellietzenders en zenders met dataverzending via GSM signaal hoeft de vogel niet te worden benaderd om de data uit te lezen en geschiedt dataverzending op afstand.
- Daarnaast wordt in voorkomende gevallen bij de vogel eenmalig een bloedmonster afgenomen, welke capillair (bij grotere vogels met een injectiespuit) wordt verzameld door aanprikken van de vene aan de onderkant van de vleugel of aan de poot. Het monster betreft niet meer dan 0,5% van het lichaamsgewicht, maar meestal veel minder (enkele druppels). Deze aanvullende handeling volgt het protocol zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1 (bloedmonster) maar wordt in combinatie met het aanbrengen van de zender/logger uitgevoerd om aanvullende informatie over conditie of geslachtsbepaling van de vogel in de zenderproef te verzamelen.

Het uitrusten van een nestjong met een nekbandje om voedsel te verzamelen (bijlage 3.4.4.3)

- Nesten van de doelsoort worden gezocht met behulp van een voor de soort geschikte methode.
- Deze aanpak wordt alleen gevolgd bij jongen uit een nest waarvan de indruk bestaat dat de oudervogels tot een goede verzorging van de jongen in staat zijn en de jongen zich in de juiste conditie (gewicht) bevinden voor hun leeftijd.
- De jongen worden gemeten en gewogen. Bij de jongen wordt een nekbandje aangebracht van dunnen stroken dubbelzijdig klittenband, welke strak – maar niet knellend! – om de hals van de nestjongen wordt aangebracht.
- Nadat een voeding door de oudervogels wordt de voedselprop uit de bek van de jongen verwijderd, waarna het nekbandje wordt verwijderd.
- Om nadelige effecten van het nekbandje op de groei van de jongen te beperken, worden de jongen na verwijdering van het nekbandje indien mogelijk bijgevoerd met eenzelfde hoeveelheid voedsel (op basis van gewicht en reeds beschikbare kennis over voedselspectrum) om te voorkomen dat ze een groeiachterstand oplopen.

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.

- Allereerst wordt voor elke soort of elke groep van soorten via literatuuronderzoek en consultatie van collega-onderzoekers achterhaald wat er reeds bekend is, en of dit niet al in voldoende mate de onderzoeksvragen beantwoordt voor het betreffende gebied.
- Na beoordeling van en instemming met de onderzoeksvragen binnen de projectgroep wordt vastgesteld op welke manier, met welke soort(en), in welke gebied(en), met wat voor technieken en in welke omvang (aantallen) het onderzoek moet worden uitgevoerd om een betrouwbaar antwoord op de vraag te verkrijgen.
- Alle handelingen (dierproeven en niet dierproeven) worden in dezelfde vangactie uitgevoerd. Gevangen vogels worden voorzien van een metalen ring, bij kleurringstudies aanvullend van een kleurring. Van alle geringde vogels worden biometrische gegevens verzameld. Deze informatie wordt binnen het specifieke onderzoeksproject (waarvan ook de dierproef onderdeel is, b.v. bij zenderstudies) gebruikt maar is ook onderdeel van andere studies, b.v. naar verspreiding of overleving van soorten via ringonderzoek. Onderzoek naar demografie van vogelpopulaties voert onze organisatie in nauwe samenwerking met partnerorganisaties van het Centre for Avian Population Studies CAPS uit (meer informatie zie <http://www.avianpopulationstudies.org>). Het meerdere keren gericht vangen van dezelfde vogel voor verschillende metingen (ringen, wegen, zender plaatsen) binnen een zelfde onderzoeksvraag komt zelden voor, kuikens met plakzenders moeten echter herhaaldelijk gevangen worden om de zender vast te plakken. Zo wordt tegelijkertijd ook de conditie gevolgd.
- Het komt vaak voor dat er diverse projecten naast elkaar lopen waarin handelingen aan wilde vogels (niet in alle gevallen dierproeven) worden toegepast. Ondanks dat er soms verschillende onderzoeksvragen aan ten grondslag liggen worden indien mogelijk metingen en handelingen aan individuen gecombineerd, om zo het aantal te vangen vogels zo veel mogelijk te beperken. Het veld van vogelonderzoekers is zo overzichtelijk en zo goed georganiseerd dat het uitvoeren van dezelfde handelingen aan dezelfde vogel voor verschillende onderzoeksprojecten in verschillende vangacties kan worden voorkomen.
- Indien literatuurstudie niet in voldoende mate in de informatiebehoefte voorziet zal in het veld aanvullende informatie worden verzameld. Als hiervoor een dierproef noodzakelijk is en de betreffende dierproef nog niet eerder op de doelsoort of een verwante soort is uitgevoerd zal deze in de vorm van een pilot op kleine schaal op enkele individuen worden getest.
- Op basis van de uitkomst van de pilot wordt in nauw overleg met de IvD besloten of al dan niet met het onderzoek verder wordt gegaan en of eventuele aanpassingen in de onderzoeksofzet nodig zijn. Wanneer uit de pilot blijkt dat de dierproef geen effect heeft op de vogels of geconcludeerd wordt dat er wel een effect is, maar dat dit als acceptabel kan worden beschouwd en valt binnen de kaders van deze projectaanvraag, zal deze op grotere schaal in het veld worden uitgevoerd.
- Tussentijdse evaluaties (minimaal jaarlijks) vinden plaats op basis van de verzamelde gegevens, waarbij wordt gekeken of de proef aanpassing behoeft.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Het nemen van een bloedmonster bij vogels
2	Het met een zender/logger uitrusten van vogels in combinatie met het nemen van een bloedmonster
3	Het uitrusten van een nestjong met een nekbandje voor voedselonderzoek
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Concept DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD25000202010465
2. Titel van het project: Onderzoek aan de populatiedynamiek van in het wild levende vogels ten behoeve van beleid, beheer en wetenschap
3. Titel van de NTS: Onderzoek aan de populatiedynamiek van in het wild levende vogels ten behoeve van beleid, beheer en wetenschap

4. Type aanvraag:

nieuwe aanvraag projectvergunning (vervolg op AVD250002015200
wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: DEC Veldwerk Nederland
- telefoonnummer contactpersoon:
- e-mailadres contactpersoon:

10.2 .e. en g

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 02-07-2020 (verzoek advies CCD 16-07-2020)
- aanvraag compleet
- in vergadering besproken: 10-07-2020 en 16-10-2020
- anderszins behandeld
- termijnonderbreking(en) van 15-07-2020 tot 11-10-2020
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
- aanpassing aanvraag: 11-10-2020
- advies aan CCD: 28-10-2020

7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 15-07-2020
 - Datum antwoorden: 11-10-2020
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-3.1: De commissie zou graag in de inleiding van het project (3.1, bijvoorbeeld onder de kop "maatschappelijk inbedding") een kort overzicht van de onder de vorige vergunning uitgevoerde projecten en opdrachten zien (vogelsoorten, experimentele handelingen en doelstellingen/vraagstellingen). Een samenvatting van enkele regels per project is voldoende.

Antwoord: gevraagde gegevens zijn in de aanvraag verwerkt.

-3.1: De commissie zou graag zien dat u al in 3.1 aangeeft wat de scope van dit project is, welke soorten opdrachten, voor welke uiteindelijke doelstellingen, de aanvrager accepteert en welke criteria daarvoor worden gehanteerd.

Antwoord: Dit is toegevoegd in de projectaanvraag onder 3.1, onder het kopje 'de aanvrager'. Belangrijk hierbij is dat de aanvrager werkt binnen de kaders van Meerjarenvisies die door bestuur en ledenraad worden vastgesteld en dat het wetenschappelijke werk wordt begeleid door een Wetenschappelijke Begeleidingscommissie. De scope van de werkzaamheden wordt weergegeven onder het kopje 'Sovon'. Het overgrote deel van de projecten heeft betrekking op vragen die vanuit landelijke of provinciale overheden worden gesteld. Het gaat om kennisvragen die een maatschappelijk belang hebben.

-3.1: Vraag 3.1, tabel 2: kunt u de grote toename van het aantal dieren dat van een zender of logger wordt voorzien toelichten en tevens aangeven wat het maximum aantal aangevraagde proefdieren voor dat doel was in het vorige project?

Antwoord: We hebben deze informatie toegevoegd in een alinea onder Tabel 1. In Tabel 2 hebben we de maximaal beschikbare proefdieren onder het huidige studieprotocol weergegeven en de realisatie met stand sept. 2020.

-3.1 De commissie wil opmerken dat op verschillende plaatsen in het project bij de aantallen dieren die worden genoemd, en bij de risico's en het ongerief van het vangen van de dieren, de kanttekening geplaatst zou kunnen worden dat het in vrijwel alle gevallen gaat om dieren die gevangen worden in het kader van het ringen en monitoren van vogels (op zichzelf geen dierproef). Bij een kleine deelverzameling daarvan maakt de aanvrager gebruik van de gelegenheid om bloed af te kunnen nemen voor onderzoek of een zender of logger aan te brengen (wat het tot een dierproef maakt). Er worden in het kader van dit project maar weinig vogels speciaal voor het onderzoek gevangen. Het ongerief dat wordt "toegevoegd" is relatief beperkt (met uitzondering van bijlage 3).

Antwoord: We hebben de kanttekening dat dieren in het kader van ringwerkzaamheden gevangen worden op een relevante plek in het projectvoorstel geplaatst (in het projectvoorstel onder tabel 2).

Bijlage 1

Vraag J, humane eindpunten (geldt ook voor de andere bijlagen): U schat de kans dat vogels bij het vangen ernstige verwondingen oplopen, die het noodzakelijk maken om het dier te euthanaseren of tijdelijk elders onder te brengen om te herstellen, op minder dan 0,5%. Dit is gebaseerd op gegevens van de ringcentrale. Per soortgroep en vangmethode zal dit waarschijnlijk nogal verschillen. Is dit onder de huidige vergunning voorgekomen? Kunt u ook informatie geven over de kans dat de vervolghandelingen (bloed afnemen, zenderen, nekbandje) tot een humaan eindpunt leiden?

Antwoord: We zijn tijdens de looptijd van het eerdere studieprotocol in geen enkel geval in de situatie gekomen dat een handeling met een humaan eindpunt moest worden afgesloten. De verschillen in de risico's zitten minder in de vangmethode maar meer in de weersomstandigheden en de tijd van het jaar. Bij wintervangsten in kustregio's (een voorbeeld van een samenspel van weersomstandigheden die ongunstig kunnen uitpakken voor de thermoregulatie van vogels) worden per vangst secure afwegingen gemaakt of door de vangst het risico op aantasting van de conditie van de te vangen vogels beperkt wordt. Op het moment dat dieren met koud weer een nat verenpak oplopen is het risico op verzwakking het grootst. Enkele keren zijn dieren tijdens een wintervangst van Scholeksters na de vangst even enkele uren aangehouden om te drogen en bij te komen. Het getal van minder dan 0,5% dat de ringcentrale geeft geldt op basis van onze ervaringen ook voor onze vangsten.

We hebben hierover een korte opmerking toegevoegd in alle bijlagen.

Bijlage 2

Vraag A: Er wordt naar gestreefd om de zender of logger zo te bevestigen dat deze na de onderzoeksperiode vanzelf afvalt. De DEC zou daarover willen opmerken dat het gebruik van zenders

die niet vanzelf afvallen, beperkt zou moeten blijven tot situaties waarin er een redelijk kans is om de vogel terug te vangen en de zender te verwijderen. Ook zou bij een zender die niet vanzelf afvalt er geen kans op extra ongerief op lange termijn als gevolg van het dragen van de zender mogen zijn. De commissie verzoekt u daar in de aanvraag wat meer tekst aan te wijden (randvoorwaarden).

Antwoord: We hebben de tekst in het projectvoorstel bijlage 2 aangevuld en hierbij bovengenoemde suggesties meegenomen. In ons voorstel wordt er echter niet vanuit gegaan dat enkel met zenders kan worden gewerkt die vanzelf afvallen. De kans op terugvangst van de vogel met zender is door omstandigheden in een situatie met dieren in het wild vaak niet redelijk maar klein. We gaan in onze aanvraag nu verder in op de afwegingen die we in dit soort situaties maken.

Bijlage 3

Vraag A: In het bijzonder bij het soort experiment dat aan de orde is in deze bijlage is de commissie geïnteresseerd in de vraag of de onderzoekers hiermee de onderzoeksvragen hebben kunnen beantwoorden. Hoe is dit onder de vorige vergunning verlopen? Hoe vaak zijn de dieren aan deze handeling onderworpen? Hebben ze dat goed doorstaan? De commissie kan zich voorstellen dat het niet eenvoudig is om bij het aanbrengen van een nekbandje in te schatten of het te strak zit.

Antwoord: Binnen het eerdere project zijn nekbandjes uitsluitend ingezet voor onderzoek aan het dieet van nestjonge Zwarte Spechten, een onderzoek dat in provincie Drenthe en provincie Noord-Brabant heeft plaats gevonden en inmiddels is afgerond. Het onderzoek had een duidelijke toepassing voor natuurbeheer. In totaal zijn in het jaar 2019 52 nestjonge Zwarte Spechten onderworpen aan dieetonderzoek middels nekbandjes. De gegevens zijn geanalyseerd en de resultaten gepubliceerd. Graag verwijzen we naar de rapporten op onze website – er is één voor een breed publiek (met name vanuit terreinbeheer) toegankelijke brochure gemaakt, en een gedetailleerd rapport. Het voedselonderzoek komt hierin goed terug, inclusief foto's van de voedselproppen. De resultaten hebben een duidelijke toepassing – het gaat om de vergelijking van het voedselaanbod in verschillend beheerde bosgebieden in Brabant en op de Veluwe. De onderzoeksvragen konden met behulp van de dierproef goed worden beantwoord, de proef met de nekbandjes heeft waardevolle aanvullende inzichten opgeleverd conform de verwachtingen in het studieplan.

<https://www.sovon.nl/sites/default/files/doc/brochure-zwarte-specht-2020.pdf>

https://www.sovon.nl/sites/default/files/doc/rap_2020-15_zwarte-specht-nbr-dr.pdf

uit het rapport:

“De Zwarte Specht verzamelt voedsel in de krop en gaat terug naar het nest wanneer deze goed gevuld is. De jongen worden diep in het nest vanuit de krop gevoerd. Onderzoek naar dieet kan daarom alleen worden uitgevoerd door het tijdelijk aanleggen van nekringen bij de jongen waardoor ze wel normaal kunnen blijven ademen, maar de voedselproppen niet kunnen doorslikken. Een onderzoeksrunde betreft twee voedingen (van één of beide ouders), waarbij na elke voeding de keelinhoud (‘voedsel-prop’) wordt verzameld. Na een onderzoeksrunde krijgen de jonge Zwarte Spechten gekweekte keverlarven (Morioker Zophobas morio) als alternatief voedsel. Onderzoek met nekringen is echter ingrijpend voor de jongen, waardoor dit slechts 2 of maximaal 3 keer per nest kan worden uitgevoerd.

Het dieet van de Zwarte Specht is in 2018/19 onderzocht bij Zoomland en Bieduinen (Titurel) op de Brabantse Wal (2 nesten; 15 voedselproppen), in zes gebieden elders in de provincie Noord-Brabant (12 nesten; 77 voedselproppen) en de Ginkel op de Veluwe in 2012-15 (8 nesten; 40 voedselproppen)”.

Aanvullend kan worden opgemerkt dat geen verhoogde sterfte bij de nestjonge spechten die onderworpen werden aan het voedselonderzoek kon worden vastgesteld. De nesten hebben een vergelijkbare ontwikkeling doorlopen als nesten waarin geen ingrepen hebben plaats gevonden.

Vraag D: kunt u hier aandacht besteden aan verfijningalternatieven die zijn overwogen? De commissie denk bijvoorbeeld aan DNA-bepalingen in feces, of het observeren (via camera's) van de oudervogels bij het aanvliegen als mogelijke alternatieven. Kunt u aangeven waarom dat niet mogelijk is (bij bepaalde

soorten) of waarom u de onderzoeksvragen daarmee niet volledig kunt beantwoorden? Wordt bij het bestuderen van de prooien die u op deze manier verkrijgt ook gekeken naar de kwaliteit ervan (dus niet alleen naar de aanwezige soorten, maar ook naar de grootte, eiwitsamenstelling e.d.)?

Antwoord: Dierproeven met behulp van nekbandjes zullen door de aanvrager slechts worden uitgevoerd indien er geen verfijningsalternatieven beschikbaar zijn. Het is een ingrijpende proef en minder ingrijpende / remote technieken zoals feces analyses of camera observaties verdienen de voorkeur – mede omdat het cruciaal voor interpretatie van onderzoeksresultaten uit proeven aan in het wild levende vogels is dat de leefomgeving van de focus dieren zo min mogelijk wordt verstoord en de ingreep door de proef zo beperkt mogelijk blijft. Immers willen we de respons van een dier in zijn natuurlijke leefomgeving meten. Er bestaan echter situaties/vraagstellingen waarbij het niet mogelijk is om met camera's of remote technieken te werken – in het geval van de nestjonge kuikens voerende Zwarte Specht wordt het voedsel in de krop van de oudervogel aangeleverd, een observatie met een camera valt daarmee af. Ter vergelijking: nestcamera's worden zeer succesvol ingezet bij de bepaling van het dieet van jongen voerende Tapuiten, de ouders brengen insecten naar de ingang van de nestholte (een gang in een duin). Met behulp van camera beelden kan het dieet in beeld worden gebracht.

Wat betreft de vraag over de relevante analyseparameters: dit is afhankelijk van de projectvraag. Er wordt altijd gestreefd naar een zo optimaal mogelijke benutting van genomen monsters, indien aanvullende meetparameters niet meteen tijdens de eerste analyse worden meegenomen dan is het gebruikelijk om monsters te bewaren om op een later moment alsnog aanvullende analyses te kunnen uitvoeren.

NTS

- Er zijn vragen gesteld en opmerkingen gemaakt over het aanpassen van de tekst van de NTS, zodat deze beter leesbaar wordt voor leken en over het toevoegen van een aantal aspecten van het onderzoek die wel in de aanvraag, maar niet in de NTS werden genoemd.

De aanvrager heeft de tekst van de NTS aangepast.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd. Eén van de DEC-leden is een oud-werknemer van de aanvrager, maar niet betrokken bij het opstellen van de aanvraag of het uitvoeren van het onderzoek.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Het hoofddoel van dit project is het verkrijgen van een verbeterd inzicht in de populatiedynamica van in het wild levende vogelsoorten. De aanvrager is een kennisorganisatie met de structuur van een vereniging die bureau- en veldonderzoek uitvoert voor diverse opdrachtgevers, waaronder Rijk, provincies, terreinbeheerders, particuliere fondsen en bedrijven. Hierbij is sprake van onderzoek naar het terreingebruik van vogels, dieetkeuze van vogels, dispersie en gezondheid en overleving. Met deze kennis kunnen soorten beter beschermd en beheerd worden en kan het effect van veranderingen (klimaat, menselijk ingrijpen in de vorm van recreatie, landbouw, visserij, energiewinning, beheer van gebieden) in of nabij leefgebieden worden ingeschat. Voor het beantwoorden van een deel van de onderzoeksvragen is het nodig om handelingen aan de dieren te verrichten die als dierproeven worden aangemerkt. Het gaat hierbij