



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.

Complex social behaviour in primates and other animals

When observing complex social behaviour in other individuals, humans tend to attribute it to complex cognition and intentions. Particularly in studies on primates, examples of this are abundant. For instance, when individual primates are grooming others (taking dirt out of the fur of others), they are supposed to

do this

a) as part of a social exchange of favours, e.g., for receiving help in fights or for being cleaned themselves in turn (Seyfarth, 1977),

b) to reconcile a fight for maintaining a good relationship (Aureli, Cords, & Van Schaik, 2002), or

c) to console the victim of an attack (Aureli, Cords, & van Schaik, 2002).

Although these patterns of complex behaviour were originally considered exclusive to primates, they have subsequently been observed in many other species. For instance, **reconciliation** of fights has been demonstrated in dogs (*Canis lupus familiaris*), goats (*Capra aegagrus*), horses (*Equus caballus*), wolves (*C. lupus*), hyenas (*Crocuta crocuta*), dolphins (*Tursiops truncatus*), and rooks (*Corvus frugilegus*) (Hemelrijk, Kappeler, & Puga-Gonzalez, 2017). **Consolation**, which has been considered indicative of cognitive empathy of which only apes were supposed to be capable, has been demonstrated in several macaque strains (*Macaca arctoides*, *sylvanus* and *tonkeana*), dogs, wolves, horses, rodents (*Microtus ochrogaster*), and rooks (Hemelrijk et al., 2017). It is unclear however, what cognitively simple behavioural rules may underlie these behavioural patterns.

Complexity science

Complexity science may be helpful in finding cognitively simple rules that may underlie complex social behaviour. Complexity science shows how complex patterns at the level of a group may arise from (cognitively simple) interactions among individuals. Using computational models, for instance, it has been shown that the complex collective motions of flocks of birds and schools of fish may arise when individuals are coordinating merely with a small number of close by neighbours (Hemelrijk & Hildenbrandt, 2012). Such models have also demonstrated that complex patterns of affiliative behaviour in primates, such as social exchange of favours, reconciliation and consolation, may emerge from simple rules (Hemelrijk et al., 2017). To test the relevance of these models, we want to study these patterns in cognitively simpler animals, such as rats.

Hypotheses on patterns of grooming, in the form of exchange, reconciliation and consolation: computational models

Cognitively simpler explanations for complex patterns of grooming in primates, such as exchange, reconciliation and consolation are given by complexity science in a computational model, called DomWorld and its extensions (Hemelrijk et al., 2017). In the models, individuals are grouping in space and if they meet someone close by, they will attack if they estimate they can beat the individual and otherwise they are likely to groom the other. The outcome of a fight is self-reinforcing, that is, after losing a fight the victim is more likely to lose the next fight, and after winning a fight the winner is more likely to be victorious again. These self-reinforcing effects of winning and losing a fight are omnipresent in animals ranging from insects, crustacean, amphibians, reptilian, fish, birds and mammals including primates to humans (Hsu, Earley, & Wolf, 2005). As a side-effect a dominance hierarchy develops even among individuals of initially the same rank. This results in a spatial-social structure with dominants in the centre and subordinates at the periphery, because lower ranking individuals are fleeing again and again and all want to stay in a group (Hemelrijk et al., 2017). As a side-effect of this social-spatial structuring and the self-reinforcing effects of winning and losing fights, DomWorld models generated patterns of exchange of grooming for support, patterns of reconciliation and of consolation similar to those in real primates (Hemelrijk et al., 2017). Because the models represent individuals with only low cognition, they generate hypotheses how patterns of social exchange, reconciliation and consolation may emerge from the interactions based on low cognition. Since these hypotheses have never been tested in rats, we like to investigate them here empirically in rats because their behaviour is easy to study in great detail.

Hypothesis on female dominance as generated in computational models

The models also generate testable hypotheses for a puzzling fact in primates, namely that females are sometimes dominant over males despite their much smaller body size and milder aggression (Hemelrijk, Wantia, & Isler, 2008). Usually body weight of female primates is about two thirds of the weight of male primates and fights initiated by females are milder and have less impact (less wounding) than those initiated by males. This explains in general subordination of females to males as the general view of primatologists is that males dominate females in species where males are bigger than females. Thus the

view on intersexual dominance is relatively static and although it is known that sometimes females may beat males by forming coalitions with other females against males, usually no other causes for dominance of females over males are considered. Remarkably, the models show, however, that the self-reinforcing effects of winning and losing fights have an effect on inter-sexual dominance, making females relatively more dominant to males when aggression is intense and when the proportion of males in the group is greater, Figure 1a (Hemelrijk et al., 2008). With relatively more males in the group, males are also more frequently losing fights from other males (Figure 1b), and, as a consequence of their low rank, this increases the chance for females to be victorious over these lower ranked males (Figure 1c). At the individual level, this results in females being relatively (to all of their fights) more often victorious over males.

These model-based hypotheses on the relation between inter-sexual dominance and sex-ratio's in groups have subsequently been confirmed in macaques with a weak dominance hierarchy (egalitarian society), macaques with a steep hierarchy (despotic) and in humans (here outcomes of conflicts were replaced by influence on collective decisions) (Hemelrijk et al., 2008; Stroebe, Nijstad, & Hemelrijk, 2017)(Hemelrijk et al, in prep).

Because the models are based on simple cognition, we hypothesize that these complex dynamics of female dominance over males should not only be found in macaques and humans but also in animal taxa such as rats. The advantage of studying this in rats is that we can manipulate sex ratios, study patterns of social interactions and physiological causes and consequences in more detail.

Note that establishing the degree of dominance of females relative to males is important, because low rank may be detrimental for females for several reasons, for instance, they may be suffering more sexual coercion (Smuts & Smuts, 1993), may have less freedom in choosing mates and may suffer from increased stress and anxiety, as may be reflected not only in behavioural parameters (Buwalda et al., 2005), but also in elevated basal levels of glucocorticoids (Melhorn et al, 2017) and in neurotransmitters and brain structures involved in the regulation of behavioural and physiological stress responses. We thus hypothesise that stress-related remodelling of the brain and accompanying elevated basal levels of glucocorticoids will be higher in females the lower their rank and thus for females that are in groups with a lower proportion of males.

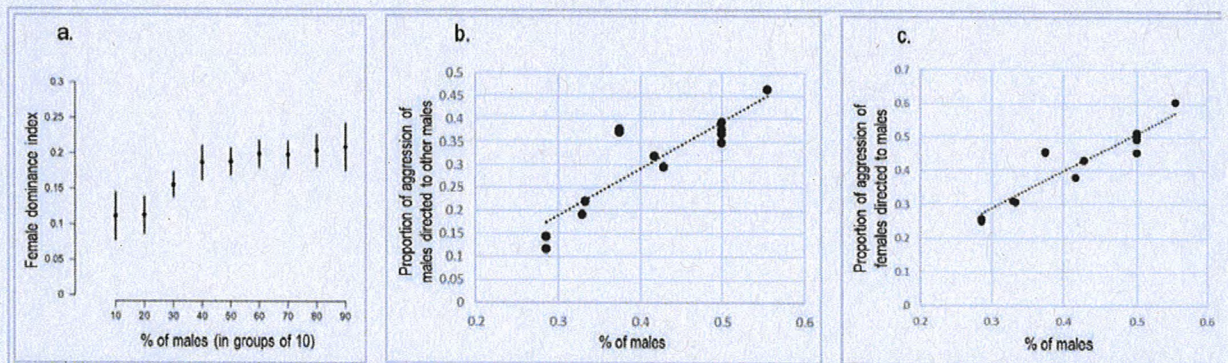


Figure 1. Modelling results from DomWorld: with proportion males there is an increase of a) female dominance, b) proportion of male-male fights and c) proportion of female-male aggression. These results form part of the hypotheses we intend to test in rats.

Specifics and relevance of testing these complex social interaction patterns in rats

The DomWorld models thus delivered hypotheses how these patterns of grooming (reconciliation, consolation, exchange) and those of intersexual dominance (depending on aggression intensity and on proportion of males in the group) may emerge from simple behavioural rules. We think that the explanations and the hypotheses delivered by the model have general relevance, because the assumptions in the model are few and often hold, and therefore we want to test them here in rats, for a number of reasons.

First, rats comply with the model-based assumptions, namely,

- 1) rats live in mixed-sex groups under natural conditions,
- 2) dominance hierarchies are known to develop in these communities (Buwalda et al., 2017; Boreman & Price, 1972)

- 3) competitive interactions depend on the winner-loser effect (Lehner, Rutte, & Taborsky, 2011),
- 4) sexual dimorphism in rats is male-biased (Calhoun, 1962),
- 5) individuals groom others (Stieger, Schweinfurth, & Taborsky, 2017).

Second, sex ratios can easily be manipulated in contrast to studies of primate groups. Therefore causality of sex ratio on female dominance can be tested with rats.

Third, in rats we can also investigate how dominance of females over males affects their wellbeing, stress and anxiety in terms of neurobiological and endocrine processes (Buwalda et al., 2005). If females are low in rank, they may suffer from increased stress and anxiety, as may be reflected in the brain and elevated basal levels of glucocorticoids (Melhorn et al., 2017). Since dominance of females may depend on proportion of males in the group, stress may depend on it too. Also stress among males may differ for groups with different sex ratios. It is much more difficult (if at all possible) to study this in primates. In our experiments we therefore also investigate behavioural, endocrine and neurobiological indicators of chronic social stress and relate these to dominance in the social colony.

Fourth, what makes our choice of studying rats extra interesting is that although dominance hierarchies are known to develop in several strains of rats (e.g. in Wistar rats, Long-Evans, Norway rats and Groningen Wild-type), hierarchies have mostly been studied for males only, seldom for females and never for both sexes in a mixed-sex group (e.g., Boreman & Price, 1972). Since males are about twice as large as females (Calhoun, 1962), the general perception is that males dominate females. Yet our computational model shows that particularly in a species where clear hierarchies are formed, we should expect that females will be dominant over some males. This is why we have chosen the Groningen wildtype rat (WTG) and indeed our pilot with the Groningen wild-type rat showed some degree of female dominance over males (see Appendix A, under estimated numbers of replicas per group).

Fifth, none of these complex patterns of affiliative social interaction (such as of grooming in the form of reconciliation) have been studied in rats.

We chose to study these questions in a specific feral rat strain, namely the Wild-type Groningen rats. These rats show a rich pattern of social behaviour, including grooming and aggressive behaviour and rapidly develop dominance hierarchies in captivity when kept in groups under semi-natural conditions in the so-called Visible Burrow System. This system resembles the natural environment of rats with a large open arena with food and water being connected to a burrow system of tunnels and chambers (Buwalda, Koolhaas, & de Boer, 2017).

Necessity of the present study

Testing these hypotheses in rats is of great importance, because scientists do not know that

a) complex patterns of social behavior such as reconciliation may emerge from simple local rules (such as interacting with individuals close by and grooming others that are too powerful in fights) instead of being intentional and a consequence of complex cognition. Based on complex cognition it was assumed, for instance, that individual animals know that it is better to reconcile fights if they want to maintain a relationship.

b) different degrees of female dominance may arise from the self-reinforcing effects of winning and losing fights. When we test, and perhaps confirm in rats the related hypothesis that female dominance over males increases with the proportion of males in the group, the phenomenon and underlying processes become known to a much larger scientific community, a community beyond primatologists. This is of great scientific importance because the phenomenon may be general. Our study would, thus contribute to general knowledge on intersexual dominance and its consequences on wellbeing via stress.

Note that our study is unique in its interdisciplinary cooperation between the empirical scientist Dr. B. Buwalda with large expertise in studying causes and consequences of social behavior in rats and Professor C. K. Hemelrijk with world-wide expertise in modeling social systems in primates.

Aureli, F., Cords, M., & van Schaik, C. P. (2002). Conflict resolution following aggression in gregarious animals: a predictive framework. *Animal Behaviour*, *64*(3), 325–343.

<https://doi.org/10.1006/ANBE.2002.3071>

Boreman, J., & Price, E. (1972). Social dominance in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Animal Behaviour*, *20*(3), 534–542. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80018-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80018-6)

Buwalda, B., Kole, M. H. P., Veenema, A. H., Huininga, M., de Boer, S. F., Korte, S. M., & Koolhaas, J. M.

- (2005). Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 83–97.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.05.005>
- Buwalda, B., Koolhaas, J. M., & de Boer, S. F. (2017). Trait aggressiveness does not predict social dominance of rats in the Visible Burrow System. *Physiology and Behavior*, 178, 134–143.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.008>
- Calhoun, J. (1962). *The Ecology and Sociology of the Norway Rat*. Bethesda, MD, USA: U.S. Department of Health, Education and Welfare.
- Hemelrijk, Charlotte K., & Hildenbrandt, H. (2012). Schools of fish and flocks of birds: Their shape and internal structure by self-organization. *Interface Focus*, 2(6), 726–737.
<https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0025>
- Hemelrijk, Charlotte K., Kappeler, P. M., & Puga-Gonzalez, I. (2017). The Self-organization of Social Complexity in Group-Living Animals: Lessons From the DomWorld Model. *Advances in the Study of Behavior*, 49, 361–405. <https://doi.org/10.1016/BS.ASB.2017.02.005>
- Hemelrijk, Charlotte K., Wantia, J., & Isler, K. (2008). Female dominance over males in primates: Self-organisation and sexual dimorphism. *PLoS ONE*, 3(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002678>
- Hsu, Y., Earley, R. L., & Wolf, L. L. (2005). Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biological Reviews*, 81(01), 33.
<https://doi.org/10.1017/S146479310500686X>
- Melhorn, S. J., Elfers, C. T., Scott, K. A., & Sakai, R. R. (2017). A closer look at the subordinate population within the visible burrow system. *Physiology & Behavior*, 178, 110–116.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.039>
- Seyfarth, R. M. (1977). A model of social grooming among adult female monkeys. *Journal of Theoretical Biology*, 65(4), 671–698. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(77\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(77)90015-7)
- Smuts, B. B., & Smuts, R. W. (1993). Male Aggression and Sexual of females in nonhuman primates and other mammals: evidence and theoretical implications. *Advances in the Study of Behavior*, 22, 1–63.
- Stroebe, K., Nijstad, B. A., & Hemelrijk, C. K. (2017). Female Dominance in Human Groups: Effects of Sex Ratio and Conflict Level. *Social Psychological and Personality Science*, 8(2), 209–218.
<https://doi.org/10.1177/1948550616664956>

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?

The main objective is fundamentally scientific, namely to test whether a number of complex patterns of social interaction that were found in primates and generated in the computational models DomWorld and extensions, are also found in rats (Hemelrijk et al., 2017). These patterns concern those of affiliative behaviour, namely grooming in the form of exchange, reconciliation and consolation and dynamics of inter-sexual dominance depending on sex ratio and will be measured in the same way as is done empirically, for grooming (Aureli, Cords, & van Schaik, 2002; Hemelrijk, 1990b, 1990a) and for inter-sexual dominance (Hemelrijk, Wantia, & Isler, 2008; Hemelrijk et al., in preparation).

Our objective is achievable because we have experience with Wildtype Groningen Rats under semi-natural conditions in the so-called Visible Burrow System. Here they are developing dominance hierarchies and show grooming behaviour (Buwalda et al., 2017).

Our specific research questions are:

- What are the characteristics of the dominance hierarchy of a group of rats with equal sex ratio of half males and half females, in terms of the traits of the hierarchy and degree of dominance of females relative to males?
- Are individuals more in the centre of the group, the higher the dominance rank of the individuals?

- Does female dominance relative to males increase with the proportion of males in the group?
- Is there an increase with the proportion of males in the group of a) the relative percentage of fights among males, b) the percentage of fights won by females against males and c) the steepness of the hierarchy?
- Does the proportion of males in the group influence the degree of reciprocation of grooming?
- How does the proportion of males in the group relate to the frequency with which males try to coerce females into mating?
- As to the grooming behaviour of rats, do individuals exchange grooming for being groomed, reconcile fights, and do individuals console others?
- How are hierarchical positions of individuals in colonies with different sex ratios related to behavioural, endocrine and neurobiological indicators of social stress and well-being?

3.3 Relevance

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

Scientifically finding these complex patterns of social interactions (of grooming, aggression and dominance) in rats is relevant, because

1. This provides further support that these patterns arise from interactions among individuals based on cognitively simple rules as suggested by complexity science (Hemelrijk et al., 2017), namely from a feedback between the spatial structure of individuals with different dominance ranks and self-reinforcing effects of winning and losing fights, without involving sophisticated cognitive skills. If female dominance relative to males in rats increases with the proportion of males in the group even though males are larger in body size than females and fiercer, it increases the evidence for the model-based hypothesis that experience of winning and losing fights (the winner-loser effect) influences female dominance in general in mammals.
2. Because we manipulate the sex ratio in our colonies of rats, we will show a causal relationship between sex ratio and social dominance between the sexes. So far in studies on primates, there was no experimental manipulation of sex ratios.
3. It is important to understand what intersexual dominance and subordination mean in terms of behavioural, endocrine and neurobiological indicators of health in both males and females and this can hardly be studied in primates, but relatively easily in rats
4. Ours will be the first study of the animal kingdom that will investigate whether there is more sexual harassment of females by males when females are lower in rank (when there are fewer males in the group).

3.4 Research strategy

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

The project concerns ethological observations of social behaviour of rats in mixed groups of males and ligated females in the Visible Burrow System. Here, rats show complex social behaviour in terms of aggression, mating and grooming, which we will record systematically. For testing hypotheses related to grooming (such as exchange, reconciliation and consolation) and related to characteristics of dominance (such as steepness) and female dominance over males (percentage males over which females are dominant and individual behaviour), we will use the same observational procedures and statistical methods as in studies of primates. Observations are done in groups of a range of sex ratios from 25% till 75% males, which is needed to test the effects of sex ratio on inter-sexual dominance. For testing hypotheses related to wellbeing and stress, results of hormonal (faecal) and neurological (brain) studies are correlated with dominance of individuals of both sexes in groups. The timeline and the roadmap of the experiments are shown below. The roadmap shows the procedures described in the next section of the proposal. Due to logistic limitations –the laboratory has only four Visible Burrow System setups, therefore the 12 replicas will be done in three cohorts or batches of four colonies.

Note that this is the optimal timeline for 12 replicas per experiment and we may need longer due to unforeseen circumstances. Besides, in case there would be a composition of group members in which

individuals would get wounded too much, we would stop after examining this sex ratio for a batch of 4 colonies. Thus we would refrain from studying the other 8 replicas. Studying them would be a no-go. We would then continue investigating groups of the other sex ratios.

Timeline

| EXPERIMENT IN VBS Month: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|--|------------|---|---|---|---|------------|---|---|---|------------|----|----|------------|----|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1. Dominance hierarchy of equal sex-ratio colonies (4M-4F) | ≈ 5 months | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Skewed sex ratio: three males and five females | | | | | | 4.5 months | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. Skewed sex ratio: five males and three females | | | | | | | | | | 4.5 months | | | | | | | | | | | | | |
| 4. Skewed sex ratio: two males and six females | | | | | | | | | | | | | 4.5 months | | | | | | | | | | |
| 5. Skewed sex ratio: six males and two females | | | | | | | | | | | | | | | 4.5 months | | | | | | | | |

Roadmap

| | | Sequence of procedures (in strict order) | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------|--|---|-------------------|---|---|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------|---|
| General scheme of each sex ratio | Duration | one day (two or three weeks before handling) | around two weeks | one day | around one week | one day | 10 days | one day | around eight weeks * | |
| | Procedure | 1. Oviduct ligation in females | 2. Handling for habituation (animals are housed in groups of 4-5 animals of same sex) | 3. Fur marking | 4. Pair housing for sexual experience (one male, one female) | 5. Faecal sampling (one day before VBS) ** | 6. Visible Burrow System (VBS) | 7a. Elevated Plus Maze ** | 7b. Faecal sampling ** | 7c. End (decapitation at the end of the day) |
| | | <p>* The first sex ratio (4 males and 4 females) requires more time for data analyses.</p> <p>** Animals require to be housed separately during these procedures, one day per procedure, in order to 1) collect samples of feces individually for hormonal analysis, and 2) to avoid the effects of social housing when animals are tested for anxiety (Elevated Plus Maze).</p> <p>NOTE: Outside the period of Visible Burrow System (VBS) observation, animals will be housed in pairs, except during faecal sampling (one day before and one day after VBS observation). To prevent the effects of former social contexts, the animals will be placed only with unfamiliar animals during the VBS observation.</p> | | | | | | | | |

Figure 2. The time line of the experiments and treatments for colonies in the VBS of different sex ratios

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.

Social complexity of groups of rats in the Visible Burrow System is studied for several sex ratios.

Basic outlines of experimental procedures in the same order as in the schedule in figure 2

1. Oviduct ligation in females to prevent undesired pregnancies and production of offspring (30 min.

surgery under anaesthesia/analgesia (O₂-isoflurane) followed by a 2-week recovery). This cannot be combined with the hair-dyeing because hair-dyeing has to be performed relatively short before VBS housing (otherwise it fades and animals cannot be recognized on video).

2. Handling: When animals come from the animal facility, and before their fur is marked, they will be housed in groups of 4-5 individuals of the same sex (whom they do not meet again). Note that in the housing in groups in the Visible Burrow System (VBS) they are housed only with unfamiliar individuals. During this period they will be handled in order to habituate to human contact and reduce the stress caused by manipulation. Animal handling is done for two weeks.

3. Marking of fur: Rats are fur marked with hair dye under O₂-isoflurane anaesthesia (30 min).

4. Pair housing: The rats will first be given sexual experience by housing them for 1 week in male-female pairs prior to placement in groups in the VBS.

5. Faecal sampling: Rats are singly housed (max. 1 day) before and after VBS housing for faecal pellet collection (measuring corticosteroid concentration).

6. VBS: Subsequently rats are placed for 10 days in the Visible Burrow System (VBS): The VBS consists of an open arena connected to a system of chambers (nests) and tunnels. The arena has a circadian light-dark cycle (12h/12h) but the burrow (nests and tunnels) is in 24h complete darkness, resembling the natural environment of feral rats. During this housing animals will be continuously video-recorded with an infrared camera in both the arena and the burrow and all behavioural interactions will be analysed afterwards. The VBS is an ideal system for several reasons: 1. The number of interactions among animals is probably higher than that in the natural situation (so we will get enough behavioural data), 2. We observe the same individuals all the time (no individuals are immigrating and emigrating like in nature) and 3. The visibility of behavioural interactions is good.

7a. Elevated Plus Maze: General anxiety-like behaviour of individuals is tested in the Elevated Plus Maze 1 day after VBS housing and will be related to the dominance position. We expect that lower ranking individuals show more anxiety and in groups with more males, we expect that females show relatively less anxiety, because we expect them to be relatively higher in rank.

7b. Faecal sampling see under 5.

7c. Decapitation: One day after VBS housing, brains will be collected to study neuronal plasticity and the impact of chronic social stress in relation to hierarchical dominance in groups in both males and females. For that purpose, rats are getting a brief exposure (30 sec) to increased CO₂ levels arising from evaporating a few dry ice pellets under a grid in the transportation cage) and subsequently are decapitated. During decapitation blood is collected for further analysis on indicators of health. Also weight of organs is taken to get further information on wellbeing. Some rats may be terminated by cardiac perfusion with aldehydes under complete anaesthesia with an overdose of pentobarbital in order to perform immunohistochemical analysis in brain sections. As regards brain analyses we aim at: a) analysis using cardiac aldehyde perfusion for immunohistochemistry, b) decapitation for structural analysis using a Golgi staining protocol and c) decapitation for protein and mRNA analysis in Western blot and qPCR.

NOTE: Before, during and after being located in the VBS, rats will be weighed. During the ten days in the VBS they will be weighted 3 times, on days 2, 5 and 9.

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 five experimental series (including 12 replicas of each), are coherent, because here we investigate a range of sex ratios namely from groups with 25% males to 75% males, so that we can test the effect of sex ratio on social behaviour, particularly on female dominance over males. A milestone is when we see some dominance of females over males, and this we have recorded already in our pilot study. There are no selection points, since all results are fine.

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 | Ethological study of social behaviour of mixed-sex groups of rats in several sex ratios in the Visible Burrow System |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Intern **10.2 e. en g** code 9065/ AVD **10.2 e. en g** **20198650**
2. Titel van het project: **The complexity of social behaviour in rats**
3. Titel van de NTS: **De complexiteit van sociaal gedrag van ratten**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **10.2 e. en g**
 - telefoonnummer contactpersoon: **10.2 e. en g**
 - e-mailadres contactpersoon: **10.2 e. en g**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **CCD verzoek om advies: 23-08-2019**
 - aanvraag compleet: n.v.t.
 - in vergadering besproken: **22-08-2019**
 - anderszins behandeld: **23-09-2019, 09-10-2019, 17-10-2019**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **28-08-2019 tot 18-09-2019, 24-09-2019 tot 30-09-2019, 10-10-2019 tot 15-10-2019**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **18-09-2019, 30-09-2019, 15-10-2019**
 - advies aan CCD: **25-10-2019**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **28-08-2019**
 - Gestelde vraag/vragen:

1/ Wat naar mening van de DEC ontbreekt is een korte vermelding van de noodzaak van deze toetsing; wat als de aanvragers het niet doen? Met andere woorden, wat bereiken de aanvragers met deze kennis?

2/ De keuze voor de rat wordt gemaakt op grond van vier overwegingen. Eén van de overwegingen (#3) is het feit dat het gebruik van ratten de onderzoekers in staat stelt te onderzoeken hoe dominantie via neurobiologische en endocriene processen het welzijn, stress en angst van ratten beïnvloedt. Dit deel van het onderzoek wordt nergens in de aanvraag theoretisch en experimenteel uitgewerkt, en ontbreekt ook in de NTS(!); alleen het aantal dieren dat er voor nodig is wordt genoemd. Een en ander komt gekunsteld over, is zelfs voor het toetsen van de hypothesen in het geheel niet van belang, en door dit onderdeel achterwege te laten is het termineren van de proefdieren van afloop van het experiment niet nodig. Kunt u uw visie hierop geven?

3/ In aansluiting op bovenstaande vraag, kunt u aangeven waarom de rat is gekozen boven één van de soorten (buiten primaten) waarbij reeds eerder patronen van complex gedrag is waargenomen zoals bijv. honden of paarden, zoals beschreven in 3.1 van de Projectbeschrijving.

4/ Er wordt gekozen voor het gebruik van het Groningen wildtype rat (WTG). Het argument om voor dit type rat te kiezen lijkt te zijn dat in een proefproject vrouwelijke dieren enige mate van dominantie over mannen laten zien. Dan rijst de vraag in hoeverre de toetsing op dit aspect van het experiment nog onafhankelijk is en of het niet verstandig is om juist voor een combinatie van twee typen rat te kiezen die op dit aspect verschillen, dus WTG en een 'docielere' type. Dat vergroot immers de kans op het begrijpen van het algemene principe en de validiteit van een en ander.

5/ T.a.v. 3.2 Purpose: de genoemde 'main objective' is wel erg kort door de bocht in het licht van de uitgebreide inleiding.

6/ T.a.v. 3.2 Onderzoeksvragen: de laatste onderzoeksvraag refereert aan het endocrien en neurobiologisch onderzoek; de DEC verwijst hierbij graag naar bovenstaande vraag 2.

7/ T.a.v. 3.3 Relevance: onder punt 3 wordt aangegeven dat het belangrijk te begrijpen wat dominantie en ondergeschiktheid betekenen in termen van ook endocrine en neurobiologische gezondheidsindicatoren en dat dit niet bij primaten maar wel bij ratten bestudeerd kan worden. Nogmaals: waarom dit belangrijk is te begrijpen wordt nergens in de aanvraag uitgewerkt (zie ook vraag 2).

8/ T.a.v. 3.4 Research strategy: er wordt een tijdlijn voor het experiment en een overzicht van handelingen gepresenteerd; hoe de volgorde van handelingen per batch precies past in de gegeven tijdlijn is niet geheel duidelijk. Er ontbreken overigens heldere go – no go momenten die er wel zouden kunnen zijn aangezien data analyse van elk deexperiment plaatsvindt voordat met het volgende deexperiment wordt begonnen.

9/ Waarom een VBS met een beperkt aantal ratten (N=8) gedurende het experiment de beste experimentele omgeving biedt wordt niet duidelijk gemaakt. Immers in de natuur kunnen dieren agressie vermijden terwijl deze optie in een VBS nauwelijks aanwezig is.

10/ Het termineren van de proefdieren lijkt niet nodig tenzij de noodzaak voor endocrien en neurobiologisch onderzoek als essentieel deel van het totale onderzoek wordt onderbouwd.
Appendix:

11/ T.a.v. A: Experimental approach: Er wordt beargumenteerd waarom elke groep uit tenminste 8 dieren moet bestaan. De onderbouwing van 12 groepen is tamelijk zwak. Kunt u dit punt verhelderen? Wat er gaat gebeuren met een groep als één van de dieren zo ziek wordt dat gezien de geformuleerde humane eindpunten, het dier uit het experiment moet worden gehaald, valt nergens te lezen.

12/ T.a.v. B: The animals: de keuze voor de WTG rat is niet gelijk aan die in de projectbeschrijving: het 'unieke' aspect van optreden van vrouwelijke dominantie wordt niet genoemd; zie ook hierboven

13/ Mannelijke ratten zijn groter en zwaarder dan de vrouwelijke dieren. Hoe vindt de keuze voor vrouwelijke en mannelijke dieren plaats om het eventuele effect uit te sluiten van grootte en gewicht?

14/ Het aantal van 8 male-female controle paren voor elk van de drie endocrinologische /neurobiologische onderzoeken wordt niet beargumenteerd.

15/ Mogelijke uitval van dieren wordt in de berekening van het totaal aantal te gebruiken dieren niet meegenomen. Misschien is dit verdisconteerd in het aantal groepen dat in elk deexperiment wordt gebruikt (N=12)? Uitval van 2 % is nog altijd zo'n 10 dieren. Wat gebeurt er bij uitval met de betreffende batch? En dan met het betreffende deexperiment?

16/ Waar het gaat om 'frequency of aggression' als uitkomstmaat, wordt aangegeven dat op basis van eerder onderzoek ook blijkt dat 8 per groep voldoende is voor een power van 80%. Welke 'effect size' deze onderzoeken rapporteren wordt niet genoemd.

17/ T.a.v. D: de 3 V's: Vervanging: onvoldoende beschreven waarom het experiment alleen met dieren kan en dan ook nog met ratten. De zin 'The model-based predictions' is niet goed te begrijpen. Vermindering: naar mening van de DEC zou de uitleg over de 12 batches wel beter kunnen.

18/ T.a.v. J: humane eindpunten: Waarom worden dieren die vanwege de geformuleerde humane eindpunten uit het experiment gehaald worden, getermineerd?

19/ Zijn er databases bij andere diersoorten die gebruikt zouden kunnen worden?

20/ De DEC zou willen adviseren de aanvraag nog op schrijffouten te controleren.

- Datum antwoord: **18-09-2019, 15-10-2019**

1/ Antw (proposal): we hebben dit apart toegevoegd op twee plaatsen onder **Hypothesis on female dominance as generated in computational models**. Nieuwe tekst in italics 'Usually body weight of female primates is about two thirds of the weight of male primates and fights initiated by females are milder and have less impact (less wounding) than those initiated by males. This explains in general subordination of females to males as the general view of primatologists is that males dominate females in species where males are bigger than females. Thus the view on intersexual dominance is relatively static and although it is known that sometimes females may beat males by forming coalitions with other females against males, usually no other causes for dominance of females over males are considered. Remarkably, the models show, however, that the self-reinforcing effects of winning and losing fights have

an effect on inter-sexual dominance, making females relatively more dominant to males when aggression is intense and when the proportion of males in the group is greater, Figure 1a (Hemelrijk et al., 2008). ' En een aparte alinea met kopje aan het eind van de introductie vlak voor de referenties, oude tekst is afwezig, nieuwe tekst in italics: **Necessity of the present study** *Testing these hypotheses in rats is of great importance, because scientists do not know that a) complex patterns of social behavior such as reconciliation may emerge from simple local rules (such as interacting with individuals close by and grooming others that are too powerful in fights) instead of being intentional and a consequence of complex cognition Based on complex cognition it was assumed, for instance, that individual animals know that it is better to reconcile fights if they want to maintain a relationship b) different degrees of female dominance may arise from the self-reinforcing effects of winning and losing fights When we test, and perhaps confirm in rats the related hypothesis that female dominance over males increases with the proportion of males in the group, the phenomenon and underlying processes become known to a much larger scientific community, a community beyond primatologists This is of great scientific importance because the phenomenon may be general Our study would, thus contribute to general knowledge on intersexual dominance and its consequences on wellbeing via stress Note that our study is unique in its interdisciplinary cooperation between the empirical scientist Dr B Buwalda with large expertise in studying causes and consequences of social behavior in rats and Professor C K Hemelrijk with world-wide expertise in modeling social systems in primates*

2/ Antw: Dank. Inderdaad hebben we dit deel van het onderzoek onderbelicht in de aanvraag en daarom hebben we nu uitleg toegevoegd op meerdere plaatsen: In de introductie van het proposal in de laatste paragraaf onder het kopje 'Hypothesis on female dominance as generated in computational models' we voegden het volgende deel toe, aangegeven in italics hieronder: *Note that establishing the degree of dominance of females relative to males is important, because low rank may be detrimental for females for several reasons, for instance, they may be suffering more sexual coercion (Smuts & Smuts, 1993), may have less freedom in choosing mates and may suffer from increased stress and anxiety, as may be reflected not only in behavioural parameters (Buwalda et al, 2005), but also in elevated basal levels of glucocorticoids (Melhorn et al, 2017) but also in elevated basal levels of glucocorticoids (Melhorn et al, 2017) and in neurotransmitters and brain structures involved in the regulation of behavioural and physiological stress responses We thus hypothesise that stress-related remodelling of the brain and accompanying elevated basal levels of glucocorticoids will be higher in females the lower their rank and thus for females that are in groups with a higher proportion of males*

Onder het derde punt onder het kopje 'Specifics and relevance of testing these complex social interaction patterns in rats', voegden we tekst toe aangegeven in italics: *Third, in rats we can also investigate how dominance of females over males affects their wellbeing, stress and anxiety in terms of neurobiological and endocrine processes (Buwalda et al, 2005) If females are low in rank, they may suffer from increased stress and anxiety, as may be reflected in the brain and elevated basal levels of glucocorticoids (Melhorn et al, 2017) Since dominance of females may depend on proportion of males in the group, stress may depend on it too Also stress among males may differ for groups with different sex ratios It is much more difficult (if at all possible) to study this in primates In our experiments we therefore also ...*

Onder 3.4.1. voegden we de tekst in italics toe (en lieten tekst over controles weg, zie vraag 14): *Observations are done in groups of a range of sex ratios from 25% till 75% males, which is needed to test the effects of sex ratio on inter-sexual dominance. For testing hypotheses related to wellbeing and stress, results of hormonal (faecal) and neurological (brain) studies are correlated with dominance of individuals of both sexes in groups The timeline and the roadmap of the experiments are shown below.*

In NTS onder 3.1 voegden we het deel in italics toe: *Het laat zien dat dominantie van vrouwen over mannen toeneemt als het percentage mannen in de groep groter wordt. Hogere dominantie van vrouwen over mannen is belangrijk voor hen voor het verminderen van hun stress in het algemeen en specifiek door het ontvangen van seksuele intimidatie, zoals gedwongen paringen Omdat de aannames in het model gelden voor allerlei zoogdieren verwachten we ...*

In NTS onder 3.1 voegden we het deel in italics toe:

Wij kozen ervoor dit te onderzoeken bij ratten, want ratten voldoen aan alle voorwaarden: zij vertonen competitief gedrag, vloeien elkaar en leven in groepen. Zij vertonen natuurlijk sociaal gedrag, de verhouding tussen de seksen in een groep is makkelijk te manipuleren en neuronale en endocriene gevolgen van stress zijn goed te onderzoeken. En vlak voor de bullet list voegden we (misschien ten overvloede) toe: Omdat het hebben van een lagere dominantie stress kan veroorzaken bestuderen we in dit experiment ook gedragsmatige, hormonale en neurobiologische indicatoren van stress in mannelijke en vrouwelijke ratten

In NTS onder 3.1 in de bullet list voegden we het laatste punt toe: *Heeft hogere dominantie van vrouwtjes ten opzichte van mannetjes een vermindering van hun sociale stress tot gevolg?*

In NTS onder 3.2 wijzigden we tekst aangegeven in italics: *Verder verbreedt ons onderzoek de inzichten in sociaal gedrag van ratten zoals ruilhandel, verzoening en troost, en de dynamiek van dominantie tussen de seksen met de bijkomende dynamiek in stress*

3/ Antw: De rat is gekozen boven een paard of een van de andere soorten met complex gedrag buiten primaten, om een aantal redenen, zoals wij puntsgewijs aangeven onder 3.1, omdat de rat veel makkelijker manipuleerbaar is dan die andere soorten (punt 2), stress is makkelijker te onderzoeken (punt3) en bij de rat is over intersexuele dominantie nog niets bekend (punt 4), terwijl van apen wel al wat bekend is, en bij de rat is niets bekend over bijvoorbeeld verzoening, terwijl we daarover wel meer weten bij paarden en geiten (en dit punt over complex affiliatief gedrag voegden we toe als punt 5). We voegden dit toe als overweging (punt 5): *Fifth, none of these complex patterns of affiliative social interaction (such as of grooming in the form of reconciliation) have been studied in rats*

4/ Antw: Goed punt. We kozen voor de Groningen wildtype rat (WTG), omdat deze lijn zeer duidelijke hiërarchieën vormt en dit is de reden waarom we verwachten dat er vrouwelijke dominantie zou kunnen zijn op basis van winnender effecten hetgeen bevestigd wordt in onze pilot studie. In doeliere lijnen van ratten (bv Wistar) worden geen heldere dominantiestructuren gevormd (ook niet in mannelijke dieren; zie studies) door de geringe agressie die vertoond wordt. We verwachten geen vrouwelijke dominantie, maar door geringe agressie kan onze hypothese ook moeilijk getoetst worden. We wijzigden de tekst (proposal (3.1 punt 4) naar: *a mixed-sex group (e.g., Boreman & Price, 1972) Since males are about twice as large as females (Calhoun, 1962), the general perception is that males dominate females Yet our computational model shows that particularly in a species where clear hierarchies are formed, we should expect that females will be dominant over some males This is why we have chosen the Groningen wildtype rat (WTG) and indeed our pilot with the Groningen wild-type rat showed some degree of female dominance over males (see Appendix A, under estimated numbers of replicas per group)*

5/ Antw: Dit vinden we moeilijk te herzien, omdat we vanwege de uitgebreide inleiding hier niet in herhaling willen vervallen. Dus hebben we, als middenweg, gekozen om het doel iets duidelijker te maken. In de nieuwe hebben we de volgende wijzigingen aangebracht, aangegeven in italics: *The main objective is fundamentally scientific, namely to test whether a number of complex patterns of social interaction that were found in primates and generated in the computational models DomWorld and extensions, are also found in rats (Hemelrijk et al., 2017). These patterns concern those of affiliative behaviour, namely grooming in the form of exchange, reconciliation and consolation and dynamics of inter-sexual dominance depending on sex ratio and will be measured in the same way as is done empirically, for grooming (Aureli, Cords, & van Schaik, 2002; Hemelrijk, 1990b, 1990a) and for inter-sexual dominance (Hemelrijk, Wantia, & Isler, 2008; Hemelrijk et al., in preparation).*

6/ Antw: Zie antwoord onder vraag 2.

7/ Antw: Zie antwoord onder vraag 2.

8/ Antw: Ten aanzien van hoe de volgorde van handelingen per batch voegden we toe onder 3.4.1. in the one before last paragraph, in italics :
The timeline and the roadmap of the experiments is shown below. The roadmap shows the procedures described in the next section of the proposal. *Due to logistic limitations –the laboratory has only four Visible Burrow System setups, therefore the 12 replicas will be done in three cohorts or batches of four colonies* Note that this is the optimal timeline for 12

We hebben in figuur 2 nummers toegevoegd voor de verschillende procedures en onder 3.4.2 in de tekst waarin we de procedures bespreken precies dezelfde volgorde van de procedures aangehouden en deze nummers ook weergegeven en ook kopjes toegevoegd, zoals 'Faecal sampling' en voegden de tekst toe (in italics):

Basic outlines of experimental procedures *in the same order as in the schedule in figure 2....*combined with the hair-dyeing and chip placement because hair-dyeing has to be performed relatively short before VBS housing (otherwise it fades and animals cannot be recognized on video).

2 Handling: When animals come from the animal facility, and before their fur is marked, they will be housed in groups of 4-5 individuals of the same sex (whom they do not meet again) Note that in the housing in groups in the Visible Burrow System (VBS) they are housed only with unfamiliar individuals. During this period they will be handled in order to habituate to human contact and reduce the stress caused by manipulation. Animal handling is done for two weeks

3 Marking of fur: Rats are fur marked with hair dye under O2-isoflurane anaesthesia (30 min)

4 Pair housing: The rats will first be given sexual experience by housing them for 1 week in male-female pairs prior to placement in groups in the VBS. The rats will first be given sexual experience by housing them for 1 week in male-female pairs prior to placement in groups in the VBS.

5. Faecal sampling: Rats are singly housed (max. 1 day) before and after VBS housing for faecal pellet collection (measuring corticosteroid concentration).

6. VBS: Subsequently rats are placed for 10 days in the Visible Burrow System (VBS): The VBS consists of an open arena connected to a system of chambers (nests) and tunnels. The arena has a circadian light-dark cycle (12h/12h) but the burrow (nests and tunnels) is in 24h complete darkness, resembling the natural environment of feral rats. During this housing animals will be continuously video-recorded with an infrared camera in both the arena and the burrow and all behavioural interactions will be analysed afterwards. The VBS is an ideal system for several reasons:

1 The number of interactions among animals is probably higher than that in the natural situation (so we will get enough behavioural data), 2 We observe the same individuals all the time (no individuals are immigrating and emigrating like in nature) and 3 The visibility of behavioural interactions is good.(toegevoegd in relatie tot punt 9)

Go – no go momenten: **Antw:**We hebben de volgende toevoegingen in tekst aangebracht aan het einde van 3.4.1. (in italics): Note that this is the optimal timeline for 12 replicas per experiment and we may need longer due to unforeseen circumstances *Besides, in case there would be a composition of group members in which individuals would get wounded too much, we would stop after examining this sex ratio for a batch of 4 colonies. Thus we would refrain from studying the other 8 replicas. Studying them would be a no-go. We would then continue investigating groups of the other sex ratios*

9/ Antw: Zeker kunnen dieren agressie vermijden in de natuur en dat kunnen ze ook in de VBS door zich minder op te houden in de centrale arena van de VBS. De VBS met een beperkt aantal ratten van 8 per groep is de ideale omgeving omdat het houden van ratten in groepen in een beperkte ruimte waarborgt dat we veel interacties tussen de ratten goed kunnen waarnemen. Deze interacties zijn nodig om het proces van verschillende maten van vrouwelijke dominantie over mannen te kunnen volgen en begrijpen. Dit is beter dan een studie in een natuurlijke omgeving om meerdere redenen,

1. De frequentie aan interacties is waarschijnlijk hoger in de VBS dan in het wild,

2. Observaties gedurende de 10 dagen observatie periode betreffen steeds dezelfde dieren in de VBS, er is geen immigratie en emigratie zoals in het wild en

3. De waarnemingsmogelijkheden van details van de interacties zijn beter dan in het wild.

Nieuwe tekst onder proposal 3.4.2 punt 5,6 bevat een toevoeging (in italics) en als geheel is het: *VBS: Subsequently rats are placed for 10 days in the Visible Burrow System (VBS): The VBS consists of an open arena connected to a system of chambers (nests) and tunnels. The arena has a circadian light-dark cycle (12h/12h) but the burrow (nests and tunnels) is in 24h complete darkness, resembling the natural environment of feral rats. During this housing animals will be continuously video-recorded with an infrared camera in both the arena and the burrow and all behavioural interactions will be analysed afterwards. The VBS is an ideal system for several reasons: 1 The number of interactions among animals is probably higher compared to that in the natural situation (so we will get enough behavioural data), 2 We observe the same individuals all the time (no individuals are immigrating and emigrating like in nature) and 3 The visibility of behavioural interactions is good*

10/ Antw: Na het experiment kunnen dieren niet in andere experimenten worden hergebruikt omdat de ervaringen van de dieren in kolonie mogelijk interfereren met uitkomsten uit vervolgeexperimenten. In ons geval geeft termineren (via decapitatie) bovendien de mogelijkheid om meer kennis uit het experiment te halen door de relatie tussen dominantiepositie en sociale stress op neuroplastische veranderingen in het brein van mannelijke en vrouwelijke ratten in relatie tot hun dominantie positie te onderzoeken, zie proposal onder 3.4.2 laatste bullet punt en appendix onder A (neurobiological outcome parameters), en L.

Nieuw onder 3.4.2 laatste punt 8:*Decapitation: One day after VBS housing, brains will be collected to study neuronal plasticity and the impact of chronic social stress in relation to hierarchical dominance in groups in both males and females. For that purpose, rats are getting a brief exposure (30 sec) to increased CO2 levels arising from*

evaporating a few dry ice pellets under a grid in the transportation cage) and subsequently are decapitated. During decapitation blood is collected for further analysis on indicators of health. Also weight of organs is taken to get further information on wellbeing. Some rats may be terminated by cardiac perfusion with aldehydes under complete anaesthesia with an overdose of pentobarbital in order to perform immunohistochemical analysis in brain sections. As regards brain analyses we aim at: a) analysis using cardiac aldehyde perfusion for immunohistochemistry, b) decapitation for structural analysis using a Golgi staining protocol and c) decapitation for protein and mRNA analysis in Western blot and qPCR

11/ Antw tav A: Experimental approach over 12 groepen (replicas),
Oude tekst herschreven we als volgt (de herziene tekst in italics): Estimated numbers of replicas of groups: We intend to study each sex ratio with 12 replicas because there is large variation in social behaviour in colonies and another study on social behaviour in rats also used 12 replicas (Tamashiro et al. 2004). *We think 12 replicas suffice because our group size is larger than that of most studies (our groups comprise 8 individuals whereas for their study of groups of 6 individuals Tamashiro et al (2004) used 12 replicas and Blanchard et al (1984) used 10 replicas)* Besides, in our studies on dominance in computational models, we also used a similar number of replicas. Twelve replicas we consider a minimum *because in case a group needs to be taken out because one group-member is seriously ill, it depends on the variability of our results for this specific sex ratio whether we need studying an extra group or can use one replica less, and in our pilot study of groups of equal sex ratio of 6 rats in the VBS female dominance showed great variation namely females were dominant over 72% of the males in one VBS, 64% in another and 0% of the males in a third*
Antw tav A (...als één van de dieren zo ziek wordt dat het eruit gehaald wordt) toegevoegd: *twelve replicas we consider a minimum because in case a group needs to be taken out because one group-member is seriously ill, it depends on the variability of our results for this specific sex ratio whether we need studying an extra group or can use one replica less, and in our pilot study of groups of equal sex ratio of 6 rats in the VBS female dominance showed great variation*

12/ Antw: dat is waar, dus voegden we deze informatie toe onder de overwegingen in B onder kopje 'the species and its origin:' (het deel in italics): ... c) *these rats have been shown to vary widely in offensive aggressive behaviour and d) they develop clear dominance hierarchies when kept in the semi-natural Visible Burrow System (Buwalda et al., 2017). In line with this, our computational model shows that particularly in a species where clear hierarchies are formed, we should expect that females will be dominant over some males (as we confirmed in a few pilot studies)*

13/ Antw: het is een feit dat mannen groter zijn dan vrouwen en dat willen we niet uitsluiten. Ook in het computer-model is dit zo en de theorie is juist dat ondanks dat vrouwen kleiner en (in principe) zwakker zijn dan mannen, ze toch soms dominant zijn over enkele mannen. Het gemiddelde en de variatie in gewicht tussen de vrouwen onderling en tussen de mannen onderling proberen we wel ongeveer gelijk te houden. We voegden het deel in italics in de appendix toe onder B:

Life stages: We use only adults, because the theory we investigate concerns just adults, both regarding female dominance and regarding complex affiliative behaviour. We use adult individuals of the same age (5 months) in order to select individuals of about the same weight per sex. In our composition of groups we aim that in different groups individuals of the same sex have weights with the same average and variance

14/ Antw: Inderdaad. Uit een recent pilot onderzoek met een PhD student blijkt voldoende neurologische variatie tussen individuen van verschillende dominantie-rang in neurologische effecten in de hersenen. Daarom hebben we besloten deze controle dieren helemaal weg te laten en het hersen-onderzoek aan alle proefdieren te doen die in de kolonie werden gehuisvest en resultaten te vergelijken tussen dieren van verschillende dominantie. Dus hebben we nu 480 dieren nodig (in plaats van 528). Verder hebben we de tekst gewijzigd door controles weg te halen en de details van de hersen analyse te verplaatsen naar proposal 3.4.2, het laatste punt, 8, laatste zin: *As regards brain analyses we aim at: a) analysis using cardiac aldehyde perfusion for immunohistochemistry, b) decapitation for structural analysis using a Golgi staining protocol and c) decapitation for protein and mRNA analysis in Western blot and qPCR*

15/ Antw: We vermoeden dat als we 12 replica-groepen gebruiken, we waarschijnlijk wel een replica kunnen missen, dus dat 12 replicas ruimte bieden voor mogelijke uitval. We voegden toe in de tekst onder A, 'estimated numbers of replicas of groups': *Twelve replicas we consider a minimum because in case a group needs to be taken out because one group-member is seriously ill, it depends on the variability of our results for this specific sex ratio whether we need studying an extra group or can use one replica less, and in our pilot study of groups of equal sex ratio of 6 rats in the VBS female dominance showed great variation namely females were dominant over 72% of the males in one VBS, 64% in another and 0% of the males in a third.*

16/ Antw: Het meest relevante artikel voor ons onderzoek over dominantie interacties is dat van de Blanchard et al 1984, die 10 replicas gebruiken voor groepen met 6 dieren, maar geen effect size noemden. We hebben deze tekst geschrapt en een analyse van een pilot studie gedaan. Daaruit konden we het volgende concluderen, zie nieuwe tekst onder 'describe which statistical methods..', onder 'the number of 8 individuals'....(c)': *Based on pilot data in a study of male and female rats housed in mixed-sex colony we scored agonistic behaviour in males and females. Mean values (+/- SD) for agonistic behaviours were for males 39±26 and for females 22±20. With an effect size of 1.2, an alpha of 0.05 and a power of 0.8 we come to a sample size of 8 individuals per group.*

17/ T.a.v. D: de 3 V's: Antw: We hebben de tekst aangepast om duidelijker te maken dat het in dit experiment juist gaat om het testen en valideren van hypothesen die in een computermodel gegenereerd zijn met "model" individuen die simpele sociale interacties met elkaar hebben. Juist voor het testen van deze hypothesen uit het computermodel willen we een empirisch experiment uitvoeren met dieren die goed bij deze "model" individuen passen: ratten. De tekst is als volgt aangepast (maar in de appendix worden op de een of andere manier de punten 1c en 1d niet zichtbaar bij ons, hopelijk wel in uw versie): *Replacement is not possible here because the aim of this study is to validate a computer model using living animals. In fact, we test empirically hypotheses that are generated in a computer model. Why rats to validate these hypotheses? In an empirical test rats are needed here, because 1 they are experimentally much easier to study than primates in several respects, namely a) manipulating sex ratio of groups, b) studying social behaviour ethologically, c) testing anxiety (in EPM) and d) studying hormonal and neuronal associates and 2 they are simpler in their cognitive and social behaviour than primates and therefore ideal for validating the hypotheses produced in the computer model on complex social behaviour and dynamics of dominance,*

3 *the rat is a new taxon for studying this and thus helps to verify the generality of our predictions* Testing model-based hypotheses is efficient

We herzagen de tekst in de laatste paragraaf onder kopje 'Replacement, the selection of the animals:' (zie italics): *Testing model-based hypotheses is efficient and may save animals, because these hypotheses have been thought through better than ad-hoc predictions that were invented during discussions* Model-based hypotheses have been developed more laboriously, because they have thoroughly been tested in a computational model We think that part of our model-based experiments (that have led to the hypotheses to be tested in the proposed study) can be seen as replacing experimental studies

Deze uitleg hebben we geprobeerd te verbeteren, zie antwoord op punt 11, hier gecopieerd: \Estimated numbers of replicas of groups: We intend to study each sex ratio with 12 replicas because there is large variation in social behaviour in colonies and another study on social behaviour in rats also used 12 replicas (Tamashiro et al. 2004). *We think 12 replicas suffice because our group size is larger than that of most studies (our groups comprise 8 individuals whereas for their study of groups of 6 individuals Tamashiro et al (2004) used 12 replicas and Blanchard et al (1984) used 10 replicas)* Besides, in our studies on dominance in computational models, we also used a similar number of replicas. Twelve replicas we consider a minimum *because in case a group needs to be taken out because one group-member is seriously ill, it depends on the variability of our results for this specific sex ratio whether we need studying an extra group or can use one replica less, and in our pilot study of groups of equal sex ratio of 6 rats in the VBS female dominance showed great variation namely females*

18/ Antw: Ze worden getermineerd omdat dieren die vanwege een te hoog ongerief of slechte gezondheid uit het experiment worden gehaald niet kunnen worden hergebruikt in andere experimenten. Om onnodig lijden verder te voorkomen worden ze vanuit die humane eindpunten getermineerd op een humane wijze. (geen wijziging in tekst).

19/ Antw: Dat is een goede vraag die wij ons ook gesteld hebben. Daar hebben we naar gezocht en die zijn er niet. Dat wil zeggen er zijn wel wat data over dominantie bij apen en seks ratio en dat analyseerden we reeds, maar we hebben voor andere taxa geen enkele soort gevonden met genoeg data alleen al om dominantie van vrouwen over mannen te analyseren laat staan betreffende vlooi gedrag, daar is hoegenaamd niks over te vinden. (We hebben geen wijzigingen in tekst aangebracht).

20/ Antw: Onze excuses voor de schrijffouten en zinnen die niet af waren. We hebben de hele tekst nogmaals gecorrigeerd.

VERVOLGVRAGEN 24-09-2019:

1/ De DEC heeft gevraagd het aantal van 12 batches beter te onderbouwen en aan te geven wat er gaat gebeuren als één van de batches uitvalt omdat een dier ziek wordt en uit het experiment gehaald moet worden. De aanvragers hebben hun best gedaan daar antwoord op te geven., Nu lees de DEC in de bijgestelde Projectbeschrijving onder 3.4.1: " *Note that this is the optimal timeline for 12 replicas per experiment and we may need longer due to unforeseen circumstances* Besides, in case there would be a composition of group members in which individuals would get wounded too much, we would stop after examining this sex ratio for a batch of 4 colonies *Thus we would refrain from studying the other 8 replicas Studying them would be a no-go We would then continue investigating groups of the other sex ratios* " In de Bijlage staat onder A: "*Twelve replicas we consider a minimum because in case a group needs to be taken out because one group-member is seriously ill, it depends on the variability of our results for this specific sex ratio whether we need studying an extra group or can use one replica less, and in our pilot study of groups of equal sex ratio of 6 rats in the VBS female dominance showed great variation namely females were dominant over 72% of the males in one VBS, 64% in another and 0% of the males in a third* De DEC bespeurt hier een tegenstrijdigheid: in het eerste geval wordt het experiment gestopt met de betreffende sex ratio terwijl in de Bijlage betoogd wordt dat het van de resultaten van die set van 12 batches afhangt of er met een batch minder kan worden volstaan of een extra batch moet worden toegevoegd. Overigens, als er besloten wordt een batch toe te voegen, zijn daar geen dieren voor aangevraagd! Kunt u bovenstaande ophelderen?

2/ Naar mening van de DEC blijft de keuze voor de rat als proefdier. Daardoor blijft het aspect 'vervanging' ook niet overtuigend.

3/ Het opofferen van de dieren vindt plaats 2 dagen na de VBS; daartussen zitten fecal collection en EPM voor zover de DEC kan zien in 'single housing'. Los van het aangehaakt zijn, is de vraag of dit niet een probleem is om de relatie tussen neurobiologie en VBS performance goed vast te stellen, want er gebeurt in de tussentijd nog het een en ander en er is geen idee of dieren 'veranderen' in de tussentijd. Kunt u dit ophelderen?

4/ De timeline volgt experimentele conditie per experimentele conditie. De vraag is of dit verstandig is: zouden de aanvragers niet juist de experimentele condities dicht bijeen willen houden in de tijd (de experimentele groepen qua tijd dicht bijeen) en dan meer series over de tijd heen doen? Dit heeft als voordeel dat aanvragers een opbouwende data base krijgen, waarmee men eerder kan zien of meer replica's zinvol zijn of niet. Immers, wanneer men een zeer grote spreiding in de data krijgt (zie de aangeleverde pilot data) dan heeft meer testen in dezelfde setting wellicht geen zin. Men kan dus eerder bijsturen. Aangezien er zoveel onzekerheid is zou je zelfs voor een pilot kunnen pleiten met die condities die het meest uiteen liggen en waarvan het verschil het beste de hypothese ondersteunt. Dan weet je gelijk of het werkt in ratten of niet. Wat is uw visie hierop?

Antwoorden (30-09-2019) op vervolgvragen van 24-09-2019:

1/ Antwoord: Sorry voor de verwarring die we veroorzaakten (We hebben uw vraag in a en b opgesplitst, zie boven):

- We zullen het experiment stoppen als er in een hele batch van een bepaalde samenstelling (dus seks ratio) in alle groepen teveel verwondingen voorkomen zoals beschreven onder 3.4.1. in het proposal (we hebben het daar over 'group composition'), maar als er slechts in een incidentele groep teveel verwondingen gevonden worden (zoals beschreven in bijlage A), dan zullen we gewoon doorgaan met de andere groepen (van dezelfde seks ratio) die geen problemen geven en hebben we (vermoedelijk) nog voldoende data voor statistiek (waarin ook de hoeveelheid data gewogen kan worden, bv in General Linear Mixed Model, GLMM).
- We zijn niet van plan een batch toe te voegen.

2/ **Antwoord:** We hebben uw vraag in a en b opgesplitst.

- a. Er is hier een deel van uw opmerking weggefallen, maar we vermoeden dat de vraag onze keuze van de rat als proefdier betreft. Die keuze hebben we naar onze overtuiging op diverse plaatsen in onze aanvraag uitgelegd: Proposal, 3.1. onder het kopje **Complexity science**, geven we aan dat complex affiliatief gedrag als emergent gevonden is in primates en dat we het nu in cognitief simpelere ratten willen testen.
- Hypotheses on patterns of grooming, in the form of exchange, reconciliation and consolation: computational models**, hier noemen we dat we ratten willen onderzoeken omdat ze daarin nooit getest zijn en we ze daarin kunnen onderzoeken in groot detail. **Hypothesis on female dominance as generated in computational models**, hier geven we aan dat de rat special interessant is omdat de complexe patronen ook in dieren egevoonden moeten kunnen worden die niet zo cognitief complex zijn als primate, end at het voordeel van het bestuderen van de rat is dat we de sex ratios kunnen manipuleren, end at we social gedrag en physiologie makkelijker in meer detail kunnen bestuderen. **Specifics and relevance of testing these complex social interaction patterns in rats:** hier geven we aan dat de resultaten van domworl algemeen relevant zijn en daarom willen we ze ook testen in ratten voor een aantal redenen. **'Necessity of the present study** en hierin geven we het belang aan van testen in ratten.
- b. Wat betreft het punt van vervanging (replacement in appendix D) We hebben met het computermodel voorspellingen gedaan en deze dienen nu in dieren getest te worden. We hebben die al getest in apen en hebben, zoals boven aangegeven, op meerdere plaatsen in het proposal uitgelegd waarom we kozen voor de rat. Misschien vraagt echter de volgende zin onder appendix D om toelichting: *'Testing model-based hypotheses is efficient and may save animals, because these hypotheses have been thought through better than ad-hoc predictions that were invented during discussions Model-based hypotheses have been developed more laboriously, because they have thoroughly been tested in a computational model We think that part of our model-based experiments (that have led to the hypotheses to be tested in the proposed study) can be seen as replacing experimental studies'* We bedoelen hier te zeggen dat de hypothesen ontwikkeld in een dergelijk computer model (dat gebaseerd is op mechanismen in dieren, zoals het winner-loser effect), zorgvuldig ontwikkeld zijn. Het zijn hypothesen waar erg goed over nagedacht is. Daarom zijn ze waardevol om te testen, in onze ogen waardevoller dan de zogenaamde ad-hoc hypothesen die je even bedenkt bij een discussie in een café bijvoorbeeld of bij het schrijven van een artikel. Wij denken dus dat we door deze zorgvuldig-ontwikkelde hypothesen te testen in zekere zin dieren sparen, omdat een vraagstelling afgeleid van dit soort modellen zinvoller is dan meestal en ook leidt tot zinvoller vervolgonderzoek.

3/ **Antwoord:** We hebben uw vraag in a, b en c opgesplitst

- a. Ondanks dat de effecten langer zichtbaar zullen blijven in het brein dan enkele dagen (zie punt c), hebben we de single housing nu ingekort tot een dag. Samenvattend: op de dag na de observaties in de VBS worden alle dieren getest in de Elevated Plus Maze (7a in het proposal 3.4.1), worden er fecal samples van hen genomen (7b) en worden de dieren opgeofferd (7c). We geven dit aan in een vernieuwde versie van figuur 2 en de bijbehorende tekst over 7a-c in het proposal 3.4.1., zie attachment.
- b. We weten niet zeker wat de **10.2 e. en g** bedoelt met het woord 'aangehaakt zijn', misschien opgefokt of gestressed zijn?
- c. Indien er sociale stress wordt ervaren door bepaalde dieren tijdens de huisvesting in de VBS is het zeer waarschijnlijk dat effecten in het brein weken langdurig zichtbaar zullen blijven. In diverse studies hebben we laten zien dat het ondergaan van sociale stress leidt tot langdurige veranderingen in plasticiteit in het brein. Zo zijn er weken na een of meerdere ervaringen van verliezen in gevechten nog duidelijk effecten waarneembaar in het brein (Patel et al. 2018, Buwalda et al. 2010, Buwalda et al. 2005, Buwalda et al. 2001, Buwalda et al. 1999). Er zijn zelfs aanwijzingen dat de effecten 9 maanden later nog zichtbaar en meetbaar zijn (Artola et al. 2006).

Referenties

- Artola, A., von Frijtag, J. C., Fermont, P. C. J., Gispén, W. H., Schrama, L. H., Kamal, A., & Spruijt, B. M. (2006). Long-lasting modulaton of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 23(1), 261-272. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04552.x>
- Buwalda, B., Felszeghy, K., Horváth, K. M., Nyakas, C., de Boer, S. F., Bohus, B., & Koolhaas, J. M. (2001). Temporal and spatial dynamics of corticosteroid receptor down-regulation in rat brain following social defeat. *Physiology & Behavior*, 72(3), 349-354. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00414-5](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00414-5)
- Buwalda, B., Kole, M. H. P., Veenema, A. H., Huininga, M., de Boer, S. F., Korte, S. M., & Koolhaas, J. M. (2005). Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 83-97. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.05.005>
- Buwalda, B., van der Borght, K., Koolhaas, J. M., & McEwen, B. S. (2010). Testosterone decrease does not play a major role in the suppression of hippocampal cell proliferation following social defeat stress in rats. *Physiology & Behavior*, 101(5), 719-725. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.08.010>
- Buwalda, De Boer, Schmidt, Felszeghy, Nyakas, Sgoifo, ... Koolhaas. (1999). Long-Lasting Deficient Dexamethasone Suppression of Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Activation Following Peripheral CRF Challenge in Socially Defeated Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(7), 513-520. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00350.x>
- Patel, D., Anilkumar, S., Chattarji, S., & Buwalda, B. (2018). Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus. *Behavioral Brain Research*, 347, 314-324. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.03.034>

4/ **Antwoord:** We hebben uw vraag in a,b,c opgesplitst.

- a. We kunnen de bestudering van verschillende seks ratios niet dichter op elkaar doen, omdat de analyse van vrouwelijke dominantie en van complex vlooi gedrag veel tijd vraagt. Om de variatie in vrouwelijke dominantie te bepalen moeten de frequenties van agressie uit de videos uitgewerkt zijn. Dat kost per groep 53 uur, voor 12 replicas dus 640 uur, dus 16 weken, oftewel ongeveer 4 maanden als de PhD student het alleen zou doen. We organiseren hulp van Msc studenten om dit in te korten. Vervolgens dient de data grafisch en statistisch geanalyseerd en hiervoor is nog eens twee weken tijd nodig. Ook de data-analyse van het vlooi gedrag kost 2 weken. We denken niet dat het nodig is meer series over de tijd te doen want we denken dat 12 replicas voldoet.
- b. Als we een grote spreiding krijgen in de resultaten zijn de resultaten iets minder betrouwbaar. Dat zou verholpen kunnen worden door het verzamelen van meer data. Het verzamelen van meer data heeft juist wel zin (in tegenstelling tot uw opmerking), maar is misschien niet nodig, want de mate van betrouwbaarheid kan meegewogen worden in de statistische analyse, zoals in General Linear Mixed Model, GLMM.

- c. Er is niet zoveel onzekerheid in onze ogen. Met twaalf replicas zijn we overtuigd (maar niet zeker) dat we voldoende data krijgen over beide thema's, vrouwelijke dominantie ten aanzien van mannen, complexe patronen van affilief gedrag als verzoening, en de relatie van dominantie seks ratio en stress. Het is wel een begrijpelijke vraag om alleen naar uiterste seks ratio's te kijken, maar het alleen maar meten van de uiterste seks ratio's is onvoldoende om iets over de relatie tussen seks ratio en female dominance te kunnen vast stellen.

- **VERVOLGVRAGEN 10-10-2019:**

- 1/ N.a.v. antwoord vraag 1. U schrijft: 'We zullen het experiment stoppen als er in een hele batch van een bepaalde samenstelling (dus seks ratio) in alle groepen teveel verwondingen voorkomen zoals beschreven onder 3.4.1. in het proposal'. Voor de DEC is dit een niet bevredigend antwoord. Als dan in 3 van de 4 groepen te veel verwondingen optreden gaat het experiment dus wel door ook al 'vechten de ratten elkaar de tent uit en vallen er doden'? Wat zijn die 'te veel verwondingen'? Hoe bepaalt men dat en wie bepaalt dat? Wat is een 'incidentele' groep? Kunt u dit verhelderen?
- 2/ Bij antwoord 1b schrijft u: 'We zijn niet van plan een batch toe te voegen'. Echter, ook als men een groep (van 8 dieren) toevoegt (dat is wat de aanvragers in de Bijlage onder A beschrijven) dan nog zijn de daarvoor benodigde dieren niet vergund volgens de huidige aanvraag.
- 3/ N.a.v. het antwoord op vraag 3a moet waarschijnlijk de bijlage aangepast maar een gereviseerde bijlage is nu niet meegestuurd. Indien er aanpassingen zijn in de bijlage, kunt u de nieuwe versie dan meesturen?
- 4/ N.a.v. antwoord vraag 4. De DEC heeft de indruk dat vraag en antwoord niet helemaal bij elkaar passen. De opzet zoals die nu wordt gepresenteerd is sequentieel van opzet. De vraag ging erover of de aanvragers niet batches van verschillende seks-ratio's tegelijk moeten meten per cohort ratten, dus in een parallelle opzet. Dan kan een data base opgebouwd zodat men gaandeweg een beeld krijgt. Dit lijkt zinvoller vanuit het oogpunt van statistiek en beperking van aantallen dieren. Wat is uw visie hierop?

Antwoorden (15-10-2019) op vervolgvragen van 10-10-2019:

1/ Antw: Dit is niet wat we bedoelden te zeggen. We bedoelden dat als we in een eerste batch van 4 kolonies zien dat een bepaalde samenstelling (seks ratio) in meerdere kolonies zulke heftige gevechten oplevert dat humane eindpunten worden bereikt (zie appendix onder J) we niet verder gaan met het testen van die samenstelling in volgende batches.

Teveel verwondingen zijn er als de verwondingen de gezondheid of het gedrag schaadt van de rat in zodanige mate dat humane eindpunten worden bereikt. Dat bepalen wij op basis van de indicatoren voor humane eindpunten zoals beschreven in de Appendix onder J humane endpoints
En dit is Nieuwe tekst, waarbij we herziening in geel aangeven (we sturen u ook de herziene Appendix toe): *Twelve replicas we consider suitable because in case a group needs to be taken out because one group-member has to be removed because humane endpoints are reached, we expect that despite the variability of our results for this specific sex ratio we can use one replica less and weigh the somewhat smaller sample size for this sex ratio statistically. In our pilot study of groups of equal sex ratio of 6 rats in the VBS female dominance showed great variation namely females were dominant over 72% of the males in one VBS, 64% in another and 0% of the males in a third*

Wat is een 'incidentele' groep? **Antw:** Hiermee bedoelen we dat als er van de 12 replica's (3 batches van 4) voor een bepaalde seks ratio in 1 kolonie een mannetje uit het experiment dient te worden genomen vanwege het bereiken van humane eindpunten, zouden we die kolonie/groep stoppen, maar de rest van de groepen (waarin geen humane eindpunten worden bereikt) gewoon bestuderen. We zouden dan die kleinere steekproefgrootte (in termen van minder replica's van die bepaalde seks ratio) statistisch corrigeren.

2/ Antw: excuses, dat was verwarrend, we bedoelden te zeggen dat als er, zoals boven genoemd, een kolonie/groep uitvalt we geen groep toevoegen. Dit hebben we aangepast onder Bijlage A (zoals ook genoemd onder ons antwoord op vraag1).

3/ Antw: We stelden in het huidige antwoord de tekst onder vervanging (in Appendix, onder replacement) bij en sturen u daarom de herziene versie van de appendix hierbij. (Ten aanzien van ons antwoord van 3a, reeds in de vorige versie van Appendix stond dat we de dieren slechts een dag na de VBS apart laten huisvesten in verband met Elevated Plus Maze, Faecal sampling en Decapitatie.)

4/ Antw: Wij begrijpen de invalshoek van de DEC. Er zijn echter wat belemmeringen met die aanpak. Ten eerste hebben we vijf verschillende groepssamenstellingen en slechts 4 kolonie (VBS) opstellingen (de groepssamenstellingen zijn 4 mannen met 4 vrouwen, 3 mannen met 5 vrouwen en omgekeerd, 5 mannen met 3 vrouwen en 2 mannen met 6 vrouwen en omgekeerd 6 mannen met 2 vrouwen). Dat betekent dat we niet elke groepssamenstelling binnen 1 trial (batch) kunt testen en dat geeft een scheefheid die we niet willen. Ten tweede wordt het lastiger om binnen 1 trial (batch) naar aanleiding van vier groepscomposities een betrouwbaar beeld te krijgen of een bepaalde compositie (seks ratio) te veel conflicten oproept en humane eindpunten worden bereikt vanwege de samenstelling van de groep. In onze benadering kunnen we na de eerste batch met 4 kolonies waarschijnlijk beter de conclusie trekken dat de compositie van de groep te veel conflicten oproept en daarom af te zien van de volgende twee batches met elk 4 groepen.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
JA
2. De aanvraag betreft **een nieuwe aanvraag**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **JA**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **n.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag past bij voorbeeld 4B van de handreiking invulling definitie project. Deze aanvraag richt zich op complex sociaal gedrag en dominantie bij dieren die in groepen leven. Mede op basis van een computermodel is gevonden dat complex sociaal gedrag ('ruilhandel van diensten', verzoening en troost) bij apen (dieren met een hoger cognitief vermogen) kan ontstaan door simpele, basale interacties tussen individuen (agressie/onderlinge vachtverzorging: 'grooming'). De vraag die in dit project gesteld wordt is in hoeverre complex sociaal gedrag, gebaseerd op basale interacties, ook voor kan komen bij dieren met minder cognitief vermogen, zoals ratten. Ook wordt – op basis van voorspellingen van het computermodel- onderzocht of de dominantie van vrouwen over mannen toeneemt als het percentage mannen in een (sociale) groep met ratten groter wordt. De uitkomsten zullen ook worden gekoppeld aan veranderingen in stress hormonen en 'brein-biochemie'/neuronale plasticiteit. Bovenstaande zal worden onderzocht in outbred ratten (Groningen Wild Type rat; WTG) in groepshuisvesting: het 'Visible Burrow System' (VBS). Dit is een systeem waarin basale interacties tussen individuen in een groep over de tijd kunnen worden gemonitord. Dit gebeurt in groepen met verschillende man/vrouw ratio's. Voor elke groep wordt –in parallel- een aantal vragen t.a.v. de basale interacties en ontwikkeling van dominantie structuur bewerkt. Lopende het project worden (sequentieel) in verschillende groepssamenstellingen (met verschillende ratio man/vrouw) deze vragen bestudeerd. Bij dit project zijn achtergrond, doelstelling en subdoelen goed beschreven en de uitkomstparameters zijn goed beschreven. Op grond van bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en toetsbaar is.

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

Voor zover de 10.2 e. en g kan beoordelen is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die uitvoering van het project in de weg kan staan; dit op basis

van de beschikbare informatie in het aanvraagformulier.

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

Het project wordt als fundamenteel gekarakteriseerd. Het fundamentele aspect bestaat uit het ophelderen of complex sociaal gedrag (gebaseerd op basale interacties) ook voor kan komen bij dieren met minder cognitief vermogen, zoals ratten. Een andere fundamentele vraag is of de dominantie van vrouwen over mannen toeneemt als het percentage mannen in de groep groter wordt en of dit geassocieerd is met veranderingen in stress hormonen en 'brein-biochemie'/neuronale plasticiteit. Naar mening van de DEC sluit de doelcategorie aan bij de hoofddoelstelling van de aanvraag.

Belangen en waarden

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

Het directe doel is het vaststellen of complex sociaal gedrag (gebaseerd op basale interacties) ook voor kan komen bij (WTG) ratten, of de dominantie van vrouwen over mannen toeneemt als het percentage mannen in de groep groter wordt en of dit geassocieerd is met veranderingen in stress hormonen en 'brein-biochemie'/neuronale plasticiteit.

Het uiteindelijk doel is om meer inzicht te krijgen in (onderliggende regels bij) complex sociaal gedrag en ontwikkeling van (vrouwelijke) dominantie bij dieren die in groepen leven.

Er is niet een directe relatie tussen het directe en uiteindelijke doel maar het directe doel is zeker gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden.

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 onderzoek zijn de proefdieren en de onderzoekers.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: integriteit van de dieren zal worden aangetast door o.a. verdoving, operatie, huisvesting in een VBS, gedragstesten en opoffering. De dieren zullen hierdoor stress ondervinden en daarmee matig cumulatief ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: vergroting van kennis m.b.t. de vraag of complex sociaal gedrag (gebaseerd op basale interacties) ook voor kan komen bij (WTG) ratten, of de dominantie van vrouwen over mannen toeneemt als het percentage mannen in de groep groter wordt en of

dit geassocieerd is met veranderingen in stress hormonen en 'brein-biochemie'/neuronale plasticiteit.

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

Er zijn in deze aanvraag geen aanwijzingen die aanleiding geven om effecten op het milieu te verwachten.

Proefopzet en haalbaarheid

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

De DEC is bekend met de ervaring van de aanvragers/onderzoeksgroep op het gebied van het gedrag van de WTG rat. De aanvragers hebben op dit gebied recent gepubliceerd in tijdschriften ,zoals Behavioural Brain Research en Behavioural Processes. Naar oordeel van de DEC is hiermee de kennis en kunde van de aanvragers voldoende gewaarborgd.

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

Onder C1 worden doelstellingen en experimentele opzet van het project nader beschreven. In de aanvraag worden, door middel van figuren, de opzet en workflow van de experimenten duidelijk beschreven. De DEC is van mening dat dit een logisch geheel vormt. De onderbouwing voor de keuze van de rat - als sociale diersoort met een minder cognitief vermogen- is door de onderzoekers afdoende gegeven.

Welzijn dieren

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

De aanvrager geeft aan dat de huisvesting van de dieren niet conform de richtlijn is: dieren zullen, voor plaatsing in een VBS, in man-vrouw paartjes gehuisvest worden. Dit om seksuele ervaring op te doen zodat in de VBS normaal sociaal gedrag getoond kan worden. Voor en na de VBS worden

dieren solitair gehuisvest, dit om feces van individuele dieren te verkrijgen. Met bovenstaande argumenten wordt naar mening van de DEC in voldoende mate onderbouwd waarom individuele/gepaarde huisvesting noodzakelijk is.

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

Naar mening van de DEC is dit punt voldoende duidelijk beschreven in de bijlage en is de inschatting realistisch te noemen: de gedragstest, het merken van de vacht onder verdoving, verzamelen van feces, verblijf in de VBS en opofferen leiden tot licht of matig cumulatief ongerief (afhankelijk van vertoonde dominantie –en de gevolgen hiervan- in de VBS). Samen met de andere procedures met licht ongerief leidt dit tot matig cumulatief ongerief bij de mannetjes. De vrouwtjes zullen als gevolg van de oviduct ligatie operatie (matig ongerief) samen met de andere procedures matig cumulatief ongerief ondergaan.

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

De integriteit van de dieren wordt aangetast door o.a. verdoving, operatie, huisvesting in een VBS, gedragstesten en opoffering.

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

De aanvrager geeft aan dat er humane eindpunten kunnen optreden. Dit zijn: afwijkende vacht, gedrag, houding, activiteit en gewichtsafname van meer dan 20%, en het lijden t.g.v. wonden. Met betrekking tot dit laatste punt heeft de DEC nog nadere vragen gesteld (zie A9; vervolgvragen 10-10-2019): *Wat zijn die 'te veel verwondingen'? Hoe bepaalt men dat en wie bepaalt dat?* Naar mening van de DEC zijn deze vragen afdoende beantwoord door de aanvragers.

3V's

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

Het bestuderen van complex sociaal gedrag en dominantie bij dieren in groepen kan alleen bij levende dieren bestudeerd worden. De DEC is van mening dat dit ook voldoende blijkt uit de projectbeschrijving.

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

Groepsgroottes zijn bepaald op basis van eerder werk, literatuur en poweranalyses. De DEC heeft nog wel vragen gesteld over de aantal geplande replicates/batches van experimenten (namelijk 12) en de

consequentie van uitval van een groep. De onderbouwing hiervoor is door de onderzoekers afdoende gegeven.

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

De aanvragers beschrijven dat, om te verzekeren dat vrouwelijke ratten voldoende herstellen voordat ze in de groep in het VBS worden gehuisvest, de oviduct ligatie ten minste één maand vóór groepshuisvesting wordt uitgevoerd. De aanvragers beschrijven verblijf in de VBS, een semi-natuurlijke omgeving, ook als verfijning. Naar mening van de DEC zijn de aanvragers met bovenstaande punten voldoende tegemoet gekomen aan de vereisten van verfijning.

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. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

In dit project worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De keuze hiervoor is een logisch gevolg van de doelstelling van het project, dit blijkt ook voldoende uit de beschrijving van de aanvraag.

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

Dieren worden in het kader van het project gedood voor uitname van het brein om 'brein-biochemie'/neuronale plasticiteit te kunnen bepalen en te kunnen relateren aan resultaten in het VBS. Dieren worden gedood door decapitatie (na korte blootstelling aan CO₂) of verbloeding onder verdoving. Dit is een voor deze diersoort passende dodingsmethode conform bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht

toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.v.t.**

NTS

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

Naar de mening van de 10.2.e.eng is dit het geval.

D. Ethische afweging

11. *Benoem de centrale morele vraag*

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project: **'The complexity of social behaviour in rats'** het matige ongerief dat de proefdieren wordt aangedaan in het onderhavige project?

Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **integriteit van de dieren zal worden aangetast door o.a. verdoving, operatie, huisvesting in een VBS, gedragstesten en opoffering. Dit alles leidt cumulatief tot matig ongerief.**

Waarden die door het onderzoek bevorderd worden: **vergroting van kennis of complex sociaal gedrag (gebaseerd op basale interacties) ook voor kan komen bij (WTG) ratten, of de dominantie van vrouwen over mannen toeneemt als het percentage mannen in de groep groter wordt en of dit geassocieerd is met veranderingen in stress hormonen en 'brein-biochemie'/neuronale plasticiteit. Dit kan leiden tot meer inzicht in (onderliggende regels bij) complex sociaal gedrag en ontwikkeling van (vrouwelijke) dominantie bij dieren die in groepen leven.**

De 10.2.e.eng is van mening dat het wetenschappelijk belang met betrekking tot het project **'The complexity of social behaviour in rats'** zwaarder weegt dan de belangen/waarden van de dieren. Voor de betrokken dieren leiden deze proeven tot licht of matig ongerief. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren wordt o.a. verdoving, operatie, huisvesting in een VBS, gedragstesten en opoffering.

Indien de doelstellingen bereikt worden zal dit project bijdragen aan kennis over de vraag of complex sociaal gedrag -gebaseerd op basale interacties- ook voor kan komen bij ratten en of de dominantie van vrouwen over mannen toeneemt bij meer mannen in een groep. Vandaar dat de 10.2.e.eng het onderhavige onderzoek vanuit wetenschappelijk oogpunt van reëel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden.

Bij deze aanvraag heeft de 10.2.e.eng o.a. gesproken over het volgende. De DEC heeft ten eerste geconstateerd dat de onderhavige aanvraag veel beter opgezet en onderbouwd is in vergelijking met een eerdere aanvraag voor hetzelfde werk (AVD 10.2.e.eng 20187164; hier is een negatief advies voor afgegeven). De DEC heeft bij de huidige aanvraag o.a. gesproken over de keuze voor de rat als model voor een sociaal dier met minder cognitieve capaciteit, de noodzaak voor endocrien en

neurobiologisch onderzoek en over de proefopzet. De aanvrager heeft de door de DEC aangedragen punten kunnen benoemen c.q. beantwoorden.

Beantwoord de centrale morele vraag.

Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

De **10.2.e.eng** beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project '**The complexity of social behaviour in rats**', dat gericht is op de vraag of complex sociaal gedrag -gebaseerd op basale interacties- ook voor kan komen bij ratten en of de dominantie van vrouwen over mannen toeneemt bij meer mannen in een groep, de opoffering en het matige ongerief dat de dieren kunnen ondergaan in dit project bevestigend.

Hoewel de **10.2.e.eng** de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het potentiële reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De **10.2.e.eng** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zeer waarschijnlijk leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise om het voorgestelde werk goed uit te voeren.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **10.2.e.eng** is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De **10.2.e.eng** is er ook van overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de **10.2.e.eng** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel '**The complexity of social behaviour in rats**', als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de **10.2.e.eng** het onderhavige projectvoorstel derhalve van een positief advies.

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. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is unaniem tot stand gekomen.

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

Mogelijke onduidelijkheden, knelpunten of dilemma's zijn in vergadering besproken en ook met de aanvragers gecommuniceerd (zie vragen bij onderdeel A.9 en de punten genoemd bij D. Ethische afweging).

Knelpunten/dilemma's bij deze aanvraag die met name opheldering behoeften waren de keuze voor de rat als proefdier voor dit specifieke werk, waarom neurobiologisch werk geïnccludeerd was in dit project, de rationale voor het aantal replicates van de experimenten en wat er met de power gebeurt als er dieren in een groep uitvallen. De DEC is over deze punten uiteindelijk tot een positief eindoordeel gekomen.



> 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 20198650
Bijlagen
2

Datum 7 februari 2020
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 20 augustus 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The complexity of social behaviour in rats" met aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 20198650. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw aanvraag af. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) niet is toegestaan het project "The complexity of social behaviour in rats" te starten.

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 25 oktober 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Voorgenomen besluit

Op 6 december 2019 hebben wij u in de gelegenheid gesteld te reageren op ons voornemen tot afwijzing van uw aanvraag. Op 16 december 2019 heeft u gereageerd op ons voornemen. - De DEC heeft naar aanleiding van uw reactie op 15 december 2019 een aanvullend advies uitgebracht. Uw reactie en het aanvullende advies van de DEC zijn betrokken bij de beoordeling van uw aanvraag.


Overwegingen

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. De beoordeling van de CCD wijkt op enkele punten af van die de DEC. Hierdoor is de uiteindelijke beoordeling van de CCD negatief uitgevallen. De CCD is voornemens om uw projectaanvraag om de af te wijzen op de hierna benoemde gronden.

Datum:

7 februari 2020

Aanvraagnummer:

AVD  20198650

Datum:
7 februari 2020
Aanvraagnummer:
AVD 20198650

Onderbouwing


Doelstellingen haalbaar met minder ongerief

Uit de wet op de dierproeven, artikel 10, lid 1, sub a, volgt dat het niet is toegestaan om 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.

In uw projectvoorstel omschrijft u het doel van uw project als volgt: "to test whether a number of complex patterns of social interaction that were found in primates and generated in the computational models DomWorld and extensions, are also found in rats." In uw reactie op het voorgenomen besluit schrijft u dat u daarnaast ten doel heeft om de fenomenen rondom dominantie en affiliatie te kunnen begrijpen. Hiervoor zijn fysiologische en neurobiologische metingen in uw ogen noodzakelijk. Wij zijn echter van oordeel dat u onvoldoende heeft onderbouwd op welke wijze de voorgestelde fysiologische en neurobiologische metingen bijdragen aan een beter begrip van deze sociale patronen ontbreekt echter in uw projectaanvraag en uw zienswijze op het voorgenomen besluit. Het is voor ons daarom niet duidelijk op welke manier de metingen bijdragen aan het behalen van de doelstelling van het project. In tegenstelling tot wat de DEC vindt, heeft u naar onze mening dan ook onvoldoende aannemelijk gemaakt waarom deze metingen noodzakelijk zijn voor het behalen van uw doelstelling. Sociaal emergente patronen zijn in onze optiek verklaarbaar zonder fysiologische en neurobiologische metingen. Namelijk, op basis van enkel basale sociale interacties en groepssamenstelling, zoals u beschrijft in uw projectvoorstel. Wij beschouwen daarom het uitvoeren van fysiologische en neurobiologische metingen, de hieraan verbonden handelingen en bijkomend ongerief niet als noodzakelijke projectonderdelen. Wij oordelen daarom dat de doelstelling van uw project met minder ongerief kan worden behaald.

Artikel 10, aanhef, lid 2, sub c uit de wet op de dierproeven bepaalt dat een dierproef zo dient te worden ingericht dat aan de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade wordt berokkend. Met betrekking tot de opzet van de projectaanvraag zijn wij er niet van overtuigd dat bepaalde handelingen aan de dieren op de meest verfijnde manier zullen worden uitgevoerd. Het gaat hier om het toepassen van anesthesie bij het kleuren van de vacht, de duur van de individuele huisvesting ten behoeve van het verzamelen van feces, en het decapiteren van de dieren onder CO₂ roes. U heeft aangegeven dat u in uw ogen voor de meest verfijnde handelswijze heeft gekozen, maar geeft in onze ogen onvoldoende inhoudelijke onderbouwing voor bepaalde methodologische keuzes. In de eerste plaats zijn wij niet overtuigd van de noodzaak om de dieren te verdoven met isofluraan

om de vacht te markeren. In de tweede plaats is de duur van solitaire huisvesting ten behoeve van de feces collectie in onze ogen langer dan noodzakelijk, waardoor de dieren onnodige stress zullen ervaren. In de derde plaats twijfelen wij aan de doseringsmethode en de effectiviteit van de beschreven CO2 roes. Daarom is het in onze ogen onzeker of de dieren voldoende verdoofd zullen zijn tijdens de decapitatie. Door het ontbreken van een inhoudelijke onderbouwing voor de hierboven benoemde methodieken zijn wij er niet van overtuigd dat in alle gevallen voor de meest verfijnde methodiek is gekozen.

Datum:
7 februari 2020
Aanvraagnummer:
AVD  20198650

In het bovenstaande hebben wij beschreven waarom wij van mening zijn dat uw projectaanvraag handelingen bevat die niet noodzakelijk zijn voor het behalen van de door u omschreven doelstelling en dat u onvoldoende aannemelijk heeft gemaakt dat de gekozen methodes in alle gevallen de meest verfijnde optie zijn. Uw reactie op ons voorgenomen besluit heeft geen nieuwe informatie opgeleverd die deze bezwaren heeft kunnen wegnemen. Wij blijven daarom bij ons eerdere standpunt uw projectaanvraag niet op de meest verfijnde manier is opgezet en in strijd is met artikel 10, lid 2, onder c, van de Wod.

Beoordeling project op gebied van schade en baten

Uit artikel 10, lid 1, sub c, van de wet op de dierproeven, volgt dat het verboden is een dierproef te verrichten waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend. In het kader van de schade-batenanalyse hebben wij in ons voorgenomen besluit aangegeven dat het wetenschappelijke belang van het verder valideren van het DomWorld model in onze ogen niet opweegt tegen belangen van de proefdieren. In uw reactie heeft u aangegeven dat dit een misverstand is en dat het onderzoek zich richt op het experimenteel onderzoeken van emergente patronen van dominantie en affiliatie op basis van in het DomWorld gegenereerde hypothesen. U benoemt dat ratten hiervoor meer geschikt zijn dan apen of mensen, omdat zij cognitief gezien beter voldoen aan de parameters van het model. Ook beschrijft u dat kennis vergaard met dit onderzoek op termijn kan leiden tot een verbetering van het dierenwelzijn door middel van een optimale geslachts-ratio bij groepshuisvesting. Deze kennis zou mogelijk ook van belang zijn voor het houden van andere soorten dieren.

Het belang van de onderzoekers en het onderzoeksveld, het vergroten van de kennis over de sociaal emergente patronen in ratten, schatten wij in als gering.

Zoals u zelf aangeeft in de achtergrond van het projectvoorstel is bekend dat complexe sociale gedragingen inmiddels gedocumenteerd zijn voor vele verschillende diersoorten, inclusief knaagdieren. Complexity science modellen, zoals DomWorld, kunnen deze gedragingen volgens u succesvol verklaren op

basis van basale regels, die weinig cognitieve vaardigheden vergen. Ook geeft u aan dat hypothesen van deze modellen over 'inter-sexual dominance' in relatie tot 'sex-ratio's' reeds zijn bevestigd in makaken en mensen. Omdat deze fenomenen al in verscheidene diersoorten zijn geobserveerd en gevalideerd is het verder valideren van deze hypothesen in het rat-model daarom van beperkte wetenschappelijke waarde.

Hoewel u aangeeft dat de resultaten van dit project op den duur mogelijk welzijnsvoordelen opleveren voor de ratten, verwachten wij dat deze voordelen zeer beperkt zullen zijn en mogelijk ook deels zonder dierproeven of middels meer verfijnde methoden behaald kunnen worden. De resultaten van dit project zullen volgens ons namelijk niet leiden tot betere huisvesting van proefdieren. Het verbeteren van het welzijn van dieren die gebruikt worden voor proefdieronderzoek is een indirect belang, waarvan het toekomstig resultaat zeer onzeker is. Dit onderzoek geeft geen antwoord op de vraag wat de optimale huisvestingsparameters zijn voor het algemene welzijn van de groep. Daarnaast is huisvesting zeer afhankelijk van het onderzoeksdoel en is gemengde huisvesting in de praktijk voor veel onderzoeksdoelen onwenselijk, waardoor de praktische toepasbaarheid van uw onderzoeksresultaten in onze ogen zeer beperkt zal zijn. Wij zijn van mening dat aan indirecte belangen die mogelijk ooit op lange(re) termijn kunnen worden behaald bij de ethische weging slechts een zeer beperkte waarde toegekend moet worden. Daarbij komt dat het onderzoeksdoel in onze ogen behaald kan worden op een meer verfijnde manier, zoals beschreven in de paragraaf 'doelstellingen haalbaar met minder ongerief'.

Tot slot heeft u aangegeven dat de proeven op termijn een impuls kunnen leveren aan humaan onderzoek, omdat de bevindingen uit uw project mogelijke als extra argument kunnen dienen om depressie en stress bij vrouwen in de menselijke maatschappij te gaan onderzoeken in relatie tot de sekse-ratio van hun directe sociale omgeving. Dit betreft echter ook een indirect belang met een onzeker resultaat. Zoals boven aangegeven, kennen wij slechts een zeer beperkte waarde toe aan dergelijke indirecte belangen.

Naast de onderzoekers en het onderzoeksveld zijn ook de proefdieren belanghebbenden in dit project. Het ongerief veroorzaakt door de handelingen in de dierproef kan worden geclassificeerd als matig. Het welzijn van de dieren zal worden aangetast door stress ten gevolge van de proeven en de integriteit van de dieren wordt aangetast door verdovingen, operaties, huisvesting in een visible burrow system en individuele huisvesting en doding. Over het geheel genomen schatten wij de waarden die voor deze dieren in het geding zijn in als een matig nadeel.

Wij zijn, anders dan de DEC, van mening dat de belangen van proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de onderzoekers en het onderzoeksveld, te weten het verkrijgen van kennis of; "a number of complex

Datum:

7 februari 2020

Aanvraagnummer:

AVD 20198650

patterns of social interaction that were found in primates and generated in the computational models DomWorld and extensions, are also found in rats". Uit de aanvraag is voor ons onvoldoende gebleken wat het wetenschappelijke belang is van het verder valideren van de bestaande hypothesen in deze specifieke diersoort. Daarnaast is in onze ogen onvoldoende aannemelijk dat de studie op termijn voordelen zal opleveren voor mens en dier.

Datum:
7 februari 2020
Aanvraagnummer:
AVD 20198650

Gezien het bovenstaande zijn wij van mening dat de doeleinden van het project het gebruik van dieren niet rechtvaardigen. Om deze reden zijn wij van oordeel dat uw aanvraag niet voldoet aan artikel 10, lid 1, sub c, van de wet op de dierproeven.

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:

7 februari 2020

Aanvraagnummer:AVD  20198650

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Weergave wet- en regelgeving



Aanvraagnummer:

AVD ^{10.2 e en 3} 20198650

Weergave wet- en regelgeving

Wet op de Dierproeven, Artikel 10

Lid 1. Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel

- a. 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;
- b. dat kan worden bereikt met behulp van een andere methode of beproevingsstrategie waarbij geen levende dieren worden gebruikt en die in de wetgeving van de Europese Unie is erkend;
- c. waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.

Lid 2. Ingeval er verschillende mogelijkheden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt de dierproef geselecteerd die in de hoogste mate aan de volgende voorwaarden voldoet en naar verwachting bevredigende resultaten oplevert:

- a. er wordt een zo gering mogelijk aantal dieren gebruikt;
- b. de betrokken dieren zijn dieren die het minst gevoelig zijn voor pijn, lijden, angst of blijvende schade;
- c. de desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade.

Wet op de Dierproeven, Artikel 10a

Lid 1. Het is verboden een project uit te voeren indien de centrale commissie dierproeven daarvoor geen projectvergunning heeft verleend.

Lid 2. Bij een aanvraag om een projectvergunning wordt een projectvoorstel gevoegd dat is afgestemd met de instantie voor dierenwelzijn.

Lid 3. De centrale commissie dierproeven komt tot een oordeel over een projectvoorstel na advies van een op grond van artikel 18a erkende dierexperimentencommissie en op grondslag van de artikelen 2, tweede en derde lid, 9, 10, 10a2, 10a4, 10b, 10d tot en met 10h, 11, 13 en 13f.

Lid 4. De kosten die verband houden met het in het derde lid bedoelde advies van een erkende dierexperimentencommissie, komen voor rekening van de aanvrager van een projectvergunning.

Lid 5. Bij ministeriële regeling wordt bepaald welke bescheiden en gegevens worden ingediend bij een aanvraag tot een projectvergunning. Bij ministeriële regeling worden regels gesteld over het bedrag dat bij indiening van de aanvraag moet worden voldaan. Het in de vorige volzin bedoelde bedrag wordt zodanig vastgesteld dat daarmee de kosten van de behandeling van de aanvraag worden gedekt.