

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202216259	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 14-07-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x					
4	NTS bij aanvraag			x						
5	E-mail CCD aan DEC verzoek om advies, d.d. 14-07-2022				x		x		x	
6	DEC-advies, d.d. 5-12-2022				x		x		x	
7	Aanvraag projectvergunning na DEC advies				x		x		x	
8	Projectvoorstel bij aanvraag				x		x		x	
9	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x		x		x	
10	NTS toelichting na DEC Advies				x		x			
11	Adviesnota aan CCD, 27-12-2022 met opmerkingen				x		x		x	x
12	Adviesnota aan CCD, 30-12-2022				x		x		x	x
13	E-mail CCD aan vergunninghouder, d.d. 30-12-2022				x		x		x	
14	Reactie op vragen CCD			x						
15	NTS na reactie CCD vragen en definitieve versie			x						
16	Aanvullende Adviesnota CCD, d.d. 27-01-2023 met opmerkingen				x		x		x	x
17	Aanvullende Adviesnota CCD, d.d. 27-01-2023				x				x	x
18	Adviesnota CCD, 31-01-2023				x		x		x	x
19	Beschikking, d.d. 31-01-2023				x		x		x	



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1

Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h

Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1

Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

- 1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h			
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
	5.1 lid2e	5.1 lid2e		
E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e			
Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
E-mailadres gemachtigde				

- Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer	5.1 lid2h			
Postcode en plaats	5.1 lid2h			
Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h			

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	5.1 lid2e	
Afdeling	5.1 lid2h	

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	Telefoonnummer	5.1 lid2e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	
		E-mailadres			
		(Titel) Naam en voorletters			
		Functie			5.1 lid2e
		Afdeling			5.1 lid2h
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	Telefoonnummer	5.1 lid2e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	
		E-mailadres			
		(Titel) Naam en voorletters			
		Functie			
		Afdeling			
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	5.1 lid2e, 5.1 lid2h		
		E-mailadres	5.1 lid2h		
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee			

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum: 01 - 08 - 2022 Einddatum (t/m): 30 - 07 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Opzetten van een multi-modaal diermodel met hart- en vaatziekten en kanker met mentale gezondheidsklachten
3.4		Naam DEC: 5.1 lid2h Postadres:

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:
30980069N

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

5.1 lid2e

Functie

5.1 lid2e

Plaats

5.1 lid2h

Datum

14-07-2022

Handtekening

5.1 lid2e



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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

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 animal
 - 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 2.1.

Owing to recent advances in clinical care, the average life expectancy has dramatically increased all over the world in recent years. Consequently, more and more previously life-threatening conditions (e.g. cancer (1) and coronary heart disease (2)) have developed into chronic diseases requiring long-term treatment

and follow-up (3-5). According to the World Health Organization (WHO), chronic diseases cause 71% of all deaths globally. Due to the aging population, more-and-more patients are presenting with multiple coexisting chronic conditions referred to as multimorbidity (6-12). Multi-morbidity, e.g., including the co-occurrence of cancer and cardiovascular disease (CVD), likely affects mortality, disease progression, disease stage at diagnosis, treatment and/or outcome of the underlying diseases (9, 13). Moreover, such debilitating conditions are also often accompanied by the development of cognitive and/or affective problems, e.g., leading to the development of mental health disorders such as major depression. Additionally, multimorbid patients often require complex health care and hence account for a relatively high proportion of healthcare costs/workload (8, 9, 13, 14).

CVD

In 2019, CVD was responsible for approximately 17.9 million deaths, whereby atherosclerosis and vascular calcification represent the majority of cardiovascular mortality. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease in which the artery narrows due to buildup of low-density lipoproteins. This buildup can cause ischemic heart disease, strokes, and peripheral vascular disease (15). Additionally, two types of vascular calcification can be distinguished by their location and associate with atherosclerotic plaque formation: intimal and medial calcification. Intimal calcification is located in the vessel intima and is associated with atherosclerosis by cellular necrosis, inflammation and lipid deposition, whereas medial calcification is prominent in the medial layer and is associated with type 2 diabetes (16).

Cancer

Cancer is the second leading cause of death globally and is responsible for an estimated approx. 10 million deaths in 2020 (17). Early detection and enhanced treatment options of cancer have led to increasing numbers of cancer survivors worldwide. Many research efforts are focused on elucidating the molecular mechanisms underlying carcinogenesis, including PD-1/CTLA-4, CCR, cytokines, P53, Notch and Wnt signaling pathways (18). Nonetheless, long-term adverse effects of cancer and anticancer treatment that affect patient survival and quality of life are unclear (6).

Mental health

Mental disorders are known to represent a major public health problem that affects patients, society, and nations as a whole. Globally, approximately 29% of all people experience a common mental disorder at some time during their lifetimes (19). Patients can be expected to develop mental disorders in response to other diseases, which will be addressed further below. More specifically, cancer patients have an elevated risk for mood and anxiety disorders, a relationship which will be addressed in this proposal (20).

Relationship between CVD, cancer and mental health

CVDs and cancer are the top two health threatening disorders worldwide, whereby their interaction with each other and their influence on mental health is uncertain (12). In the past years, epidemiological studies addressed many factors that are involved in CVD, cancer, and mental health. Although cancer can cause atherosclerosis and vascular calcification through different mechanisms, the most common are antitumor drugs and radiotherapy (RT), whereby chest RT increases the risk of ischemic heart disease with 5- to 10-fold. However, patients with cancer often have metabolic and vascular abnormalities (21). According to a recent cohort study, the incidence of cancer is 3.1% in atherosclerosis patients during a mean follow-up of 33 months (21). A diagnosis of cancer is associated with the development of vascular calcification and atherosclerosis (22). Therefore, the term cardio-oncology arises around 2018 as a new profession, which combines cardiovascular diseases with cancer types. Although this subject is very broad and complicated due to the different cardiovascular diseases that can interact with different cancer types, it is very important that we investigate this subject for future therapies and patients. Looking at the influence on mental health, cancer patients have an elevated risk for mood and anxiety disorders, whereby the most common risk factors were female sex and older age at diagnosis (20). The prevalence of anxiety disorders in cancer patients is 23.4%, whereby anxiety disorders were most prevalent in lung cancer patients (23). We will address a few factors below that are of interest in this proposal (Figure 1).

Risk factors

Shared risk factors for CVD and cancer are: age, sex, smoking, obesity, diet, and genetics, whereby CVD and cancer influence mental health. Smoking is a well-known risk factor for CVD and cancer, whereby the mortality risk increases 2- to 3-fold of death in smokers compared to nonsmokers. Smoking causes vascular constriction and affects blood pressure, lipid metabolism and the coagulation system. A recent study showed that smoking has a dose-response relationship with atherosclerosis and that cessation substantially lowers the risk of disease development (24). Furthermore, nicotine promotes vascular calcification in vascular smooth muscle cells (VSMCs), which are important cell types involved in atherosclerosis (25). Regarding to cancer, smoking increases the risk of cancer at 14 different sites, in which new insights link both breast and prostate cancer to smoking (26). Therefore, smoking plays an important role in both CVD and cancer. Due to a poor diet and sedentary lifestyle, the rising rates of obesity, increases the risk for both CVD and cancer. Lipid accumulation in the body results in chronic inflammation and lipid accumulation in the vessels, leading to atherosclerosis development. In addition, long-term cohort studies suggest that obesity increases the risk of cancer with 14% in men and 20% in women (26).

Inflammatory theory

Cells are very plastic and change during course of disease. Atherosclerosis and cancer are both characterized by low-grade, chronic inflammation, whereas inflammation serves as a risk factor for development of mood and anxiety disorders. During the first stages of atherosclerosis, apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins trigger activation of the intimal layer. This process attracts various kinds of inflammatory cells, notably monocytes-derived macrophages, T lymphocytes and mast cells. Developing atherosclerotic lesions also include monocyte-derived dendritic cells, various subsets of B lymphocytes and neutrophils (27). The inflammatory response amplification is also seen during mood and anxiety disorders, characterized by an increased expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors, increased levels of acute-phase reactants, chemokines and soluble adhesion molecules in the circulation and cerebrospinal fluid (28). When acute inflammation is not resolved in time, it can transform into chronic inflammation resulting in an immunosuppressive microenvironment. This environment is characterized by immunosuppressive cells, including M2 macrophages, Treg cells and myeloid-derived suppressor cells. These changes increase the risk to activate oncogenes, DNA and protein damage, release of reactive oxygen species (ROS), and affect multiple signaling pathways including NF- κ B, K-RAS, and P53, leading to chronic diseases, including cancer. Contradictory, inflammation does not only promote the immune response (acute inflammation) but can also lead to immune surveillance (chronic inflammation) in cancer. During acute inflammation, mature dendritic cells can regulate anti-tumor immune responses by inducing inflammatory responses via multiple mechanisms (e.g., cross-presenting the tumor antigens and priming tumor-specific CD8⁺ T cells), whereas chronic inflammation leads to recruitment of immunosuppressive cells (29, 30).

Matrix

Tissues are composed of multiple cell types, including fibroblasts, endothelial cells, and VSMCs. VSMCs are the major cell type present at all stages of atherosclerosis, hence functions of VSMCs in plaques have been underestimated over the years. Atherosclerosis is characterized by the phenotypic alteration of VSMCs, depending on different factors, including stress. Research showed that VSMCs can adopt alternative phenotypes, including phenotypes that resemble foam cells, macrophages, mesenchymal stem cells and osteochondrogenic cells which can influence atherosclerotic plaque progression (31). When altered towards an osteochondrogenic phenotype, vascular calcification is induced, increasing the risk of thrombus formation¹⁸. However, the mechanisms behind these specific phenotypes remain unknown.

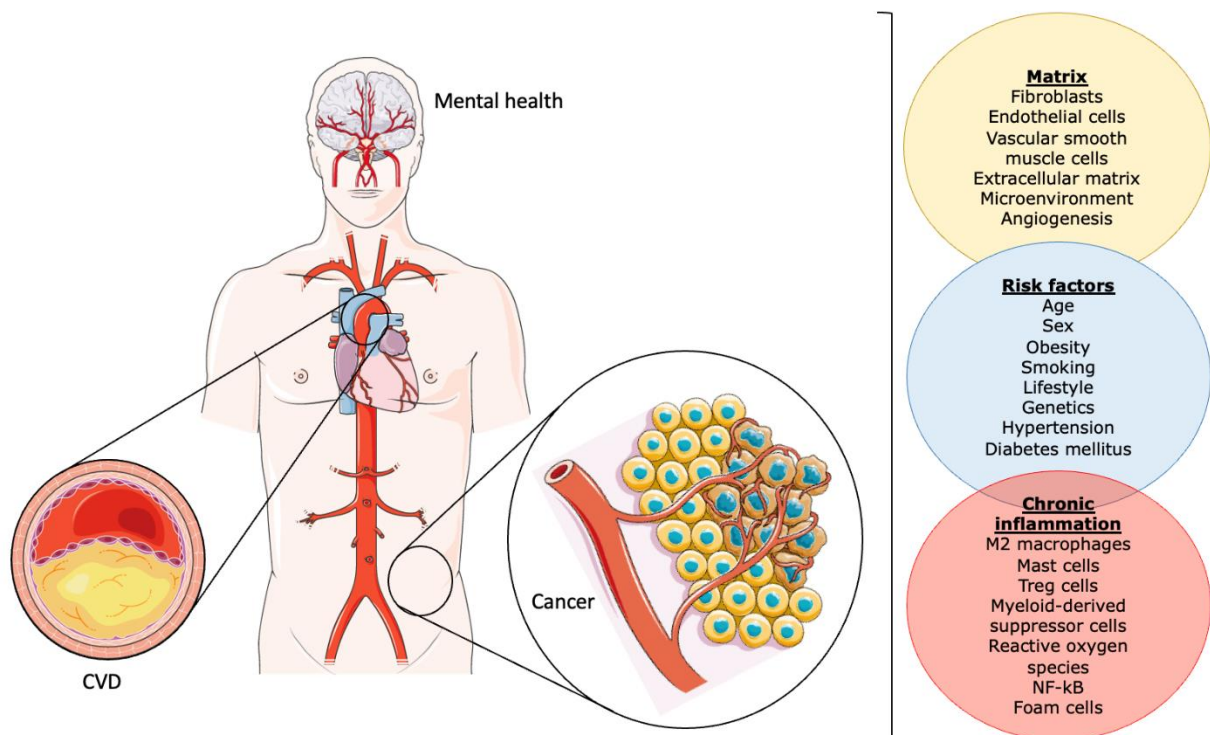


Figure 1: Multimorbidity between CVD, cancer, and its influence on mental health. CVD and cancer are the two major chronic diseases, whereby the influence on mental health is to be investigated. This proposal will focus on atherosclerosis and vascular calcification. On the right, the overlapping factors from different categories between CVD, cancer, and mental health are depicted, which indicate factors that could be entangled and/or influence each other.

Previous research

Although our clinical care prolongs life exponentially, multimorbidity results in decreased quality of life. The current knowledge of multi-morbidity is derived from patient data, which is limited and mostly associative. Clinical data shows that cancer survivors are at increased risk of CVD, related to treatment induced adverse effects, and have a 2-6 times higher risk of cardiovascular mortality (7). Over the past years, due to increasing life expectancy, clinical care has shifted from treatment of CVD to prevention and early detection. Interactions between morbidities and the consequences of these interactions for treatment are currently not studied in fundamental research. Additionally, studying the causal interaction between the morbidities in the clinical setting is far from ideal, due to the complexity of the diseases and the required expertise. Therefore, the development and use of a multi-modal animal model is a necessity for future research. As such, examining how comorbidities drive diseases could be valuable since it may reveal unknown fundamental pathways and provide new therapeutic angles that could, in the future, translate to the clinic. Several animal models for multi-morbidity have been published in recent years (32-36) including animal models combining CVD and renal failure (11), CVD and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (33), hypertension and stroke (34) and CVD/COPD and smoking (35). However, these models do not combine CVD, cancer, and mental health. Accordingly, the current proposal aims to develop a rat multi-model disease model that combines CVD and cancer and their influence on mental health, ultimately leading to new therapeutic targets for both diseases.

Overall purpose of this research

In summary, the novelty of our approach is the establishment of a multi-modal disease model whereby the underlying mechanisms of multiple chronic disease, in particular atherosclerosis, vascular calcification, and cancer, as well as their consequences on mental health, can be studied.

In this application, we describe the *in vivo* experiments that are necessary to allow successful establishment of the model. Hereby, we defined 'CVD' as the combination of atherosclerosis and vascular calcification throughout the rest of the proposal. The key features of this application include:

- (1) Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats;
- (2) Establish a multi-morbidity model containing CVD and cancer;
- (3) Focus on the underlying mechanism between CVD and cancer
- (4) Asses the consequences of multi-morbidity on mental health

Hereby, the first aim focusses on the establishment of a CVD model in rats, as research for CVD is mostly based on mouse models. The rat has been chosen as species based on our extensive experience within cancer therapy, imaging, and experiments addressing mental health (37-39). When successfully established in one or both rat strains, the multi-morbidity model will be established. Based on our own *in vitro* and *in vivo* data, as well as published data of others, we have been able to apply the principle of the three R's for the above-mentioned aims. Throughout the application, we will indicate where and how we have used principles of replacement, refinement, and reduction. The complication of combining atherosclerosis, vascular calcification, cancer, and mental health requires state-of-the-art quantification techniques for plaque build-up and cancer growth. Therefore, terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy will be used in this proposal. In addition, cognition and effect-related behavioral testing will be performed to assess the mental health of the animals. Where appropriate, clear go/no-go decisions will be indicated.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Ultimate goal

We aim to establish a multi-modal disease model studying the effects of atherosclerosis, vascular calcification, and cancer and their influence on mental health. This pilot will provide important information on the interaction between those diseases.

Aim 1. Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

The first aim is very important for the establishment of the multi-model disease model, since we aim to achieve a model containing atherosclerosis, vascular calcification, and tumour growth, which is only achievable when the required level of CVD is met (any form of plaque build-up) (40, 41). For this purpose, the CVD levels will be determined via terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for these specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. To achieve this aim, we have defined a set of immediate sub-aims (a detailed description is provided in section 3.4.):

1.1 Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

These experiments will determine to what extend atherosclerosis can be established in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats, whereby one or both rat species will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.1, Figure 2).

1.2 Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

These experiments will determine to what extend calcification can be established in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats, whereby one or both rat species will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.2, Figure 2).

1.3 Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

These experiments will determine to what extent atherosclerosis and vascular calcification can be induced in one model, establishing a CVD model. This model will be further used in aim 2 (Figure 2).

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing CVD and cancer

When the experimental approach leading to atherosclerosis and vessel calcification has been determined, aim 2 will be conducted to establish tumour growth in addition to CVD pathologies (37). These experiments will determine to what extent CVD can be combined with cancer in one model, multi-morbidity model, combining the two most health threatening disorders.

Aim 3. Study the underlying mechanisms between CVD and cancer

When the experimental approach leading to a multi-morbidity model has been determined, aim 3 will be conducted to further discover the underlying mechanism connecting these pathologies. To achieve this aim, we have defined a set of immediate sub-aims (a detailed description is provided in section 3.4.):

3.1 Establish a multi-morbidity model with atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

The established atherosclerosis model of aim 1.1 will be extended by induction of cancer in WAG/Rij and/or SD- Apoe^{tm1sage} rats.

3.2 Establish a multi-morbidity model with calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

One or both rat species from aim 1.2 are selected to determine to what extent calcification and cancer can be established in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats.

Aim 4. Study the influence of atherosclerosis, vascular calcification and/or cancer on mental health

To study if CVD and tumor growth affects the well-being of the animals affect cognition and affect-related behaviors, several non-invasive behavioral tests will be performed. More specifically, for this purpose, during all three aims, before exposing the animals to the various imaging modalities, the cognition- and affect-related behavioral effects of genetic variation (WAG/Rij & SD-Apoe^{tm1sage}) and the distinct (phased) interventions (atherosclerosis, vessel calcification and tumorigenesis) will be examined to assess to which extent physical multi-morbidity in the context of this project contributes to variations in mental health of the animals. To control for physical limitations that may impact on performance in the various behavioural test, overall locomotor performance will be studied as well (42). This aim will be implemented over all three aims.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The aims formulated here are direct consequences of previous and ongoing work within our group and our collaborators. Our groups consist of highly motivated and skilled senior scientists, postdocs, PhD-students and technicians, which are certified experts in the execution of animal experiments. The proposed research will be executed by 1 PhD student, with the help of technicians experienced in animal and imaging experiments. Our groups are experts in the field of cardiology, oncology, mental health and imaging, as can be judged by our work published in many peer-reviewed publications (e.g., in the past 4 years, the involved principal investigators published 160 articles in international journals). The project summarized here has been positively judged by the faculty and the research institutes, who provide the necessary budget to execute these experiments. The technical procedures summarized in this proposal are routinely performed in our lab, evidenced by the competency files of our employees. Dedicated technical staff will handle animals and all experiments will be carried out by experienced scientists/technicians with the appropriate certificates and hands-on experience, which will ensure adherence to the principles of replacement, reduction, and refinement. All equipment needed for animal experimentation is accessible, and animal models required for performing the research described here are available in [5.1 lid2h](#)

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

<input checked="" type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

In the current aging population, more and more patients present with multi-morbidity, i.e., with multiple co-existing chronic diseases. It has been shown that patients that are presented to the clinic with a chronic disease will develop a second chronic condition with a very high likelihood. We want to investigate why there is a great chance of having multiple chronic disorders. It is likely that the chronic diseases with these patients present interact. There are 7 major groups of chronic disease, whereby vascular diseases, cancer, and mental health are three of them. However, interactions between atherosclerosis, vascular calcification, mental disorders, and cancer have not been studied in detail even though e.g., cancer patients/survivors often also suffer from cardiovascular disease (8, 43-46). A potential shared mechanism of chronic diseases is senescence or pre-mature ageing of stem cells accounting for multiple diseases.

Society as a whole is suffering from increased healthcare costs which are at least partly due to increasing numbers of patients that present with multi-morbidities and chronic disease. Additionally, expenditures per capita increase dramatically in patients with a chronic condition. It is estimated that approximately 83% of all healthcare money is spent on chronic conditions, five times larger compared to patient without chronic disease (47).

By sharing our work to other scientists and clinicians, we will contribute to a vital, dynamic and transparent knowledge sharing culture. Moreover, with our research, we aim to establish an animal model for multi-morbidity in order to study interactions between pathologies.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

This project is funded by multiple departments at [5.1 lid2h](#), which includes: [5.1 lid2h](#). Each of the research schools has experts in different fields: cardiology, oncology, mental health and imaging. Scientists and their respective research institutes and universities will benefit from the outcome of this proposal as the multi-modal disease model will guide them in the further understanding of the underlying mechanisms between the different diseases.

The other stakeholder of this project is experimental animals and patients. To achieve our specific aims, we will use WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats. Animals will be negatively affected as they suffer discomfort from the different procedures during the experiments. At the end of the experiments, organs will be harvested for further molecular investigations to identify molecular mechanism. The experimental design and all experimentation procedures will be performed according to the 3R's principles (see below) by qualified personnel. Furthermore, the knowledge that is gathered within this proposal can contribute to better treatment options and future therapies, not only for CVD, cancer, and mental health patients, but for multi-morbidity patients with CVD, cancer, thereby considering the influence on mental health.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

To reach our main objective, i.e., to establish a multi-modal disease model studying the effects of atherosclerosis, vascular calcification and cancer to one another, we have formulated the following overall milestones:

- (1) Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats;
- (2) Establish a multi-morbidity model containing CVD and cancer;

- (3) Focus on the underlying mechanism between CVD and cancer
- (4) Asses the consequences of multi-morbidity on mental health

The experimental approach is outlined in **Figure 2/3/4**.

Aim 1. Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

To achieve this aim, two different rat models will be studied to see which one results in substantial atherosclerosis development. Pre-selection of the rat models is based on their tumor susceptibility and development without extensive metastasis. The two selected rat models are:

- (5) WAG/Rij rats (commercially available from licensed breeder; not susceptible for atherosclerosis development) in which an AAV8 vector expressing PCSK9 (commercially available; which decreases LDLr expression and therefore enhances cholesterol sensitivity) will be injected
- (6) SD-Apoe^{tm1sage} rats (commercially available atherosclerosis model from licensed breeder; susceptible for atherosclerosis development).

Aim 1.1. Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For aim 1.1, groups will either receive a WTD or chow diet at the age of 8-10 weeks, whereby a chow diet serves as a control for SD-Apoe^{tm1sage} rats due to their susceptibility for atherosclerosis development. Next, the extent of atherosclerosis will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for specific disease pathways, i.e., apoptosis (anxA5), hypoxia (18F-HX4), inflammation (Rantes and 18FDG) that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, atherosclerosis will be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (**see Appendix 1, and Figure 2**) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments. Specifically, if there was no quantifiable effect on atherosclerotic plaque formation, animals will not be used in experimental aim 1.3 and 3.1 (**go/no-go decision, Figure 2**).

Decision strategy aim 1.1:

- (7) For each rat model, when no atherosclerosis yield is present, aim 2 will not be investigated for that model

Intended results aim 1.1:

- (8) We will determine to what extend atherosclerosis can be induced in WAG/Rij or/and SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent.
- (9) Determine the effect of atherosclerosis on the animal's mental health

Aim 1.2. Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

WAG/Rij rats will receive a WTD diet, whereas SD-Apoe^{tm1sage} rats will receive a chow diet at the age of 8-10 weeks. Calcification will be induced via diet supplemented warfarin (VKA) and vitamin K₁. Next, the extent of calcification will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for specific disease pathways, i.e., apoptosis (anxA5), calcification (Na18F and fetuin-A), hypoxia (18F-HX4), inflammation (Rantes and 18FDG) that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, calcification will be studied using other parameters (e.g., immunohistochemistry) (see **Appendix 1, and Figure 2**) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments. Specifically, if there was no quantifiable effect on calcification (medial or intimal), animals will not be used in experimental aim 1.3 and 3.1 (**go/no-go decision, Figure 2**).

Decision strategy aim 1.2:

- (10) For each rat model, when no vascular calcification yield is present, aim 2 will not be investigated for that model

Intended results aim 1.2:

- (11) We will determine vascular calcification can be induced in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent.
- (12) Determine the effect of vascular calcification on the animal's mental health

Aim 1.3. Establish a CVD model, combining atherosclerosis and calcification, in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

In these experiments, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be used in experiments aimed to established atherosclerosis and, simultaneously, vessel calcification. For that purpose, the animals will receive a WTD or WTD enriched with warfarin (VKA) and vitamin K₁. Afterwards, the extent of atherosclerosis and vascular calcification, and the influence on each other, will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for specific disease pathways, i.e., apoptosis, calcification, hypoxia, inflammation) that will be tested in sequential analysis. In addition, atherosclerosis and vascular calcification will be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (**see Appendix 1, and Figure 2**) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments animals to proceed. Specifically, if there was no quantifiable effect on atherosclerotic plaque formation/calcification, animals will not be used in experimental aim 2 (**go/no-go decision, Figure 2**).

Decision strategy aim 1.3:

- (13) For each rat model, when no CVD yield is present, aim 2 will not be investigated for that model

Intended results aim 1.3:

- (14) We will determine to what extend CVD can be induced in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent
- (15) Determine the effect of CVD on the animal's mental health

During the experiments, in the last three weeks prior to imaging, the animals will be exposed to several non-invasive behavioral tests to investigate the effect of multi-morbidity on the animal's mental health. First of all, cognitive performance of the animals will be tested using the Y-maze continuous alternation test and the object recognition test. Motor performance as well as anxiety-related behaviour will be scored using open field testing. Anxiety-related behaviour will be further examined using the elevated zero maze test, whereas anhedonia (as a measure of depressive-like behaviour) will be assessed using the sucrose preference test. Physical disorders involving atherosclerosis and tumor growth are likely to affect mental health. In order to map model-induced effects on mental health, several non-invasive behavioral cognition- and affect-related tests will be performed.

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing CVD and cancer

In these experiments, rats (WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, depending on go/no-go decision), will be used in experiments aimed to established atherosclerosis and, simultaneously, vessel calcification. For that purpose, the animals will receive a WTD or WTD enriched with warfarin (VKA) and vitamin K₁. During the diets the animals will also (depending on the animal strain) be subjected to either implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas (WAG/Rij) or injected with RK3E-ras cells (SD-Apoe^{tm1sage}). Afterwards, the extent of CVD and cancer, and the influence on each other, will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes (see above) for specific disease pathways (i.e. apoptosis, calcification, hypoxia, inflammation) that will be tested in sequential analysis. In addition, disease presence will also be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (**see Appendix 1, and Figure 3**) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments animals to proceed. Only if a multi-morbidity model is accomplished, aim 3 will be performed to investigate the molecular mechanisms (**go/go-no decision, Figure 3**). Non-invasive behavioral tests will be performed as described in aim 1.

Decision strategy aim 2:

- (16) For each rat model, when no CVD and tumor growth yield is present, aim 3 will not be investigated for that model

Intended results aim 2:

- (17) We will determine to what extent CVD and cancer can be induced in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent
- (18) Determine the effect of CVD and cancer on the animal's mental health

Aim 3. Study the underlying mechanisms between atherosclerosis or vascular calcification and cancer

Aim 3.1. Study the underlying mechanisms between atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For aim 3.1, groups will either receive a WTD or chow diet at the age of 8-10 weeks, whereby a chow diet serves as a control for SD-Apoe^{tm1sage} rats due to their susceptibility for atherosclerosis development. During the diets the animals will also (depending on the animal strain) be subjected to either implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas (WAG/Rij) or injected with RK3E-ras cells (SD-Apoe^{tm1sage}). Next, the disease extent will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes (see above) for specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, disease presence will be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (see **Appendix 1, and Figure 4**) to acquire information about the underlying mechanisms. Non-invasive behavioral tests will be performed as described in aim 1.

Intended results aim 3.1:

- (19) Determine underlying mechanisms of multi-modal disease for atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats
- (20) Determine the effect of atherosclerosis and cancer on the animal's mental health

Aim 3.2. Study the underlying mechanisms between calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

WAG/Rij rats will receive a WTD diet, whereas SD-Apoe^{tm1sage} rats will receive a chow diet at the age of 8-10 weeks. Calcification will be induced via diet supplemented warfarin (VKA) and vitamin K₁. During the diets the animals will also (depending on the animal strain) be subjected to either implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas (WAG/Rij) or injected with RK3E-ras cells (SD-Apoe^{tm1sage}). Next, the disease extent will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes (see above) for specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, disease presence will be studied using other parameters (e.g., immunohistochemistry) (see **Appendix 1, and Figure 4**) to acquire information about the underlying mechanisms. Non-invasive behavioral tests will be performed as described in aim 1.

Intended results aim 3.2:

- (21) Determine underlying mechanisms of multi-modal disease for calcification and cancer in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats
- (22) Determine the effect of calcification and cancer on the animal's mental health

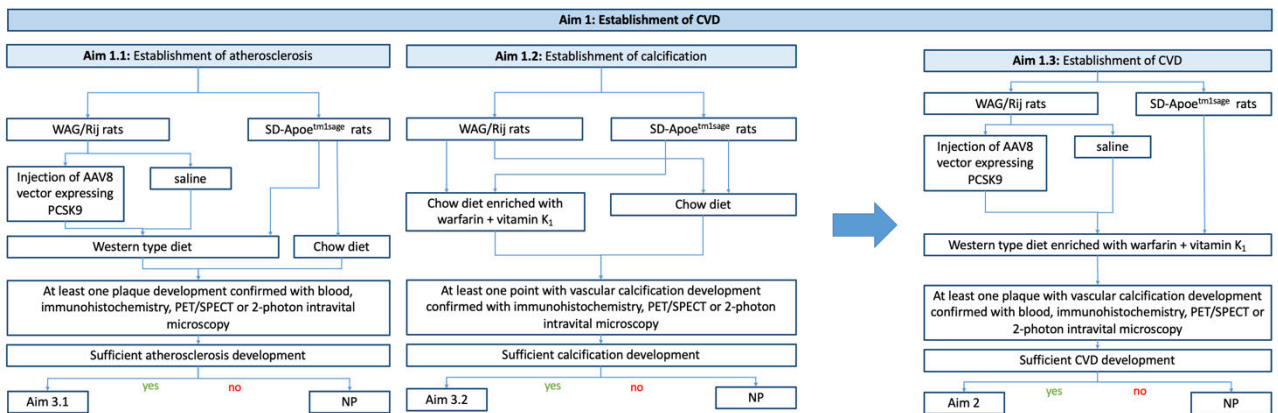


Figure 2: GO/no-GO flow chart with decision tree for aim 1. No progression; NP.

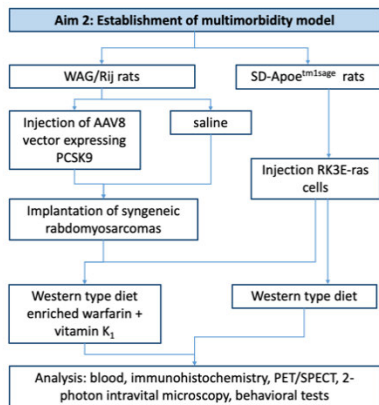


Figure 3: GO/no-GO flow chart with decision tree for aim 2. No progression; NP.

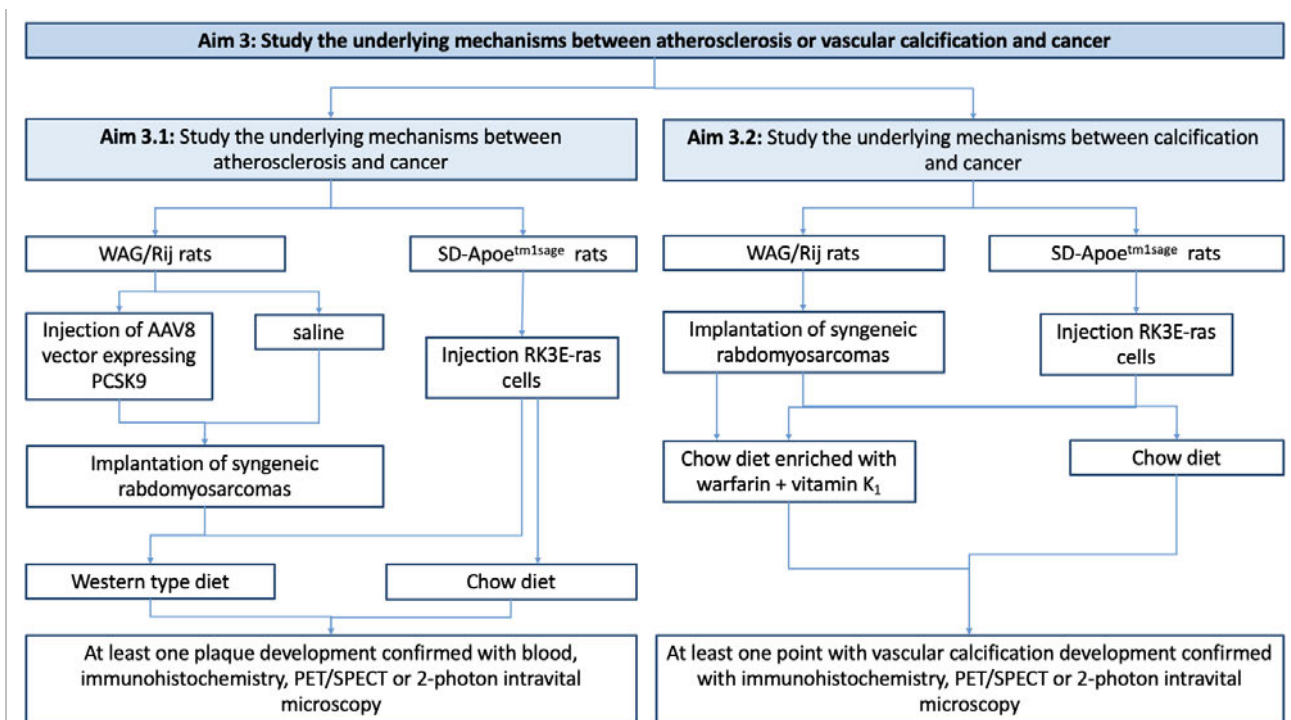


Figure 4: Experimental set-up for aim 3.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

This is a project proposal aimed at addressing four main questions:

- (1) Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats;
- (2) Establish a multi-morbidity model containing CVD and cancer;
- (3) Focus on the underlying mechanism between CVD and cancer
- (4) Asses the consequences of multi-morbidity on mental health

As described above in more details, the proposal follows a logical order (**Figure 2, 3 and 4**) from the experiments to define the optimal model in a stepwise approach, with clear Go/no-Go decisions. Only the model with effective development of atherosclerosis and vascular calcification will be further investigated in aim 2 and 3.

For all the described aims and sub-aims, an overview of models, experimental procedures and anticipated discomfort is listed in Appendix 1.

3.4.3 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	Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health.
2	
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	

References

1. Phillips JL, and Currow DC. Cancer as a chronic disease. *Collegian*. 2010;17(2):47-50.
2. Mensah GA, Wei GS, Sorlie PD, Fine LJ, Rosenberg Y, Kaufmann PG, et al. Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications. *Circ Res*. 2017;120(2):366-80.
3. Eurostat S. Mortality and life expectancy statistics. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Mortality_and_life_expectancy_statistics. Accessed 23-01-2021.
4. Population Division WpP. Probabilistic Projections of female life expectancy at birth using life expectancy at birth estimates. <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/EX/Female/900>.
5. Population Division WpP. Probabilistic Projections of male life expectancy at birth using life expectancy at birth estimates. <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/EX/Male/900>. Accessed 26-01-2022.
6. Teske AJ, Linschoten M, Kamphuis JAM, Naaktgeboren WR, Leiner T, van der Wall E, et al. Cardio-oncology: an overview on outpatient management and future developments. *Neth Heart J*. 2018;26(11):521-32.
7. Kamphuis JAM, Linschoten M, Cramer MJ, Alsemgeest F, van Kessel DJW, Urgel K, et al. ONCOR: design of the Dutch cardio-oncology registry. *Neth Heart J*. 2021;29(5):288-94.
8. Barnett K, Mercer SW, Norbury M, Watt G, Wyke S, and Guthrie B. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet*. 2012;380(9836):37-43.
9. Nunes BP, Souza ASS, Nogueira J, Andrade FB, Thume E, Teixeira D, et al. Multimorbidity and population at risk for severe COVID-19 in the Brazilian Longitudinal Study of Aging. *Cad Saude Publica*. 2020;36(12):e00129620.
10. Shao M, Lin X, Jiang D, Tian H, Xu Y, Wang L, et al. Depression and cardiovascular disease: Shared molecular mechanisms and clinical implications. *Psychiatry Res*. 2020;285:112802.
11. Young K, and Singh G. Biological Mechanisms of Cancer-Induced Depression. *Front Psychiatry*. 2018;9:299.
12. Organization WH. Noncommunicable diseases. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. Accessed 21-12-2021.
13. Organization WH. Multimorbidity. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252275/9789241511650-eng.pdf>. Accessed 21-12-2021.
14. Wammes JJG, Tanke M, Jonkers W, Westert GP, Van der Wees P, and Jeurissen PP. Characteristics and healthcare utilisation patterns of high-cost beneficiaries in the Netherlands: a cross-sectional claims database study. *BMJ Open*. 2017;7(11):e017775.
15. Kobiyama K, and Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res*. 2018;123(10):1118-20.
16. Mizobuchi M, Towler D, and Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1453-64.
17. Organization WH. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Accessed 22-12-2021.
18. Xu X, Balk SP, Isaacs WB, and Ma J. Calcium signaling: an underlying link between cardiac disease and carcinogenesis. *Cell Biosci*. 2018;8:39.
19. Steel Z, Marnane C, Iranpour C, Chey T, Jackson JW, Patel V, et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int J Epidemiol*. 2014;43(2):476-93.

20. De R, Zabih V, Kurdyak P, Sutradhar R, Nathan PC, McBride ML, et al. Psychiatric Disorders in Adolescent and Young Adult-Onset Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2020;9(1):12-22.
21. Raposeiras Roubin S, and Cordero A. The Two-way Relationship Between Cancer and Atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2019;72(6):487-94.
22. Whitlock MC, Yeboah J, Burke GL, Chen H, Klepin HD, and Hundley WG. Cancer and Its Association With the Development of Coronary Artery Calcification: An Assessment From the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(11).
23. Naser AY, Hameed AN, Mustafa N, Alwafi H, Dahmash EZ, Alyami HS, et al. Depression and Anxiety in Patients With Cancer: A Cross-Sectional Study. *Front Psychol*. 2021;12:585534.
24. Ding N, Sang Y, Chen J, Ballew SH, Kalbaugh CA, Salameh MJ, et al. Cigarette Smoking, Smoking Cessation, and Long-Term Risk of 3 Major Atherosclerotic Diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(4):498-507.
25. Petsophonsakul P, Burgmaier M, Willems B, Heeneman S, Stadler N, Gremse F, et al. Nicotine promotes vascular calcification via intracellular Ca²⁺-mediated, Nox5-induced oxidative stress and extracellular vesicle release in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2021.
26. Johnson CB, Davis MK, Law A, and Sulpher J. Shared Risk Factors for Cardiovascular Disease and Cancer: Implications for Preventive Health and Clinical Care in Oncology Patients. *Can J Cardiol*. 2016;32(7):900-7.
27. Back M, Yurdagul A, Jr., Tabas I, Oorni K, and Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(7):389-406.
28. Miller AH, and Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(1):22-34.
29. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):263.
30. Liu L, Zhang SX, Liao W, Farhoodi HP, Wong CW, Chen CC, et al. Mechanoresponsive stem cells to target cancer metastases through biophysical cues. *Sci Transl Med*. 2017;9(400).
31. Basatemur GL, Jorgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, and Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(12):727-44.
32. Hewitson TD, Holt SG, and Smith ER. Animal Models to Study Links between Cardiovascular Disease and Renal Failure and Their Relevance to Human Pathology. *Front Immunol*. 2015;6:465.
33. Khedoe PP, Rensen PC, Berbee JF, and Hiemstra PS. Murine models of cardiovascular comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(11):L1011-27.
34. Cho S, and Yang J. What Do Experimental Models Teach Us About Comorbidities in Stroke? *Stroke*. 2018;49(2):501-7.
35. Lo Sasso G, Schlage WK, Boue S, Veljkovic E, Peitsch MC, and Hoeng J. The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med*. 2016;14(1):146.
36. AlSiraj Y, Chen X, Thatcher SE, Temel RE, Cai L, Blalock E, et al. XX sex chromosome complement promotes atherosclerosis in mice. *Nat Commun*. 2019;10(1):2631.
37. Dubois L, Landuyt W, Haustermans K, Dupont P, Bormans G, Vermaelen P, et al. Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [(18)F]fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. *Br J Cancer*. 2004;91(11):1947-54.
38. Barendsen GW, and Broerse JJ. Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV x-rays. I. Effects of single exposures. *Eur J Cancer*. 1969;5(4):373-91.
39. Kim SA, Kim HW, Kim DK, Kim SG, Park JC, Kang DW, et al. Rapid induction of malignant tumor in Sprague-Dawley rats by injection of RK3E-ras cells. *Cancer Lett*. 2006;235(1):53-9.
40. Schurgers LJ, Joosen IA, Laufer EM, Chatrou ML, Herfs M, Winkens MH, et al. Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype. *PLoS One*. 2012;7(8):e43229.
41. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffers PM, DeMey JG, and Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*. 2007;109(7):2823-31.

42. Sierksma AS, van den Hove DL, Pfau F, Philippens M, Bruno O, Fedele E, et al. Improvement of spatial memory function in APPswe/PS1dE9 mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D. *Neuropharmacology*. 2014;77:120-30.
43. Blane DN, and Lewandowska M. Living with cancer and multimorbidity: the role of primary care. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2019;13(3):213-9.
44. Cavers D, Habets L, Cunningham-Burley S, Watson E, Banks E, and Campbell C. Living with and beyond cancer with comorbid illness: a qualitative systematic review and evidence synthesis. *J Cancer Surviv*. 2019;13(1):148-59.
45. Williams GR, Deal AM, Lund JL, Chang Y, Muss HB, Pergolotti M, et al. Patient-Reported Comorbidity and Survival in Older Adults with Cancer. *Oncologist*. 2018;23(4):433-9.
46. (UK) NGC. *Multimorbidity: Assessment, Prioritisation and Management of Care for People with Commonly Occuring Multimorbidity*. National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2016 Sep.
47. Schneider KM, O'Donnell BE, and Dean D. Prevalence of multiple chronic conditions in the United States' Medicare population. *Health Qual Life Outcomes*. 2009;7:82.



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

Serial number	Type of animal procedure
1	Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We aim to establish a rat model in which the combination of CVD and cancer and their influence on mental health can be studied, using previously described work (1-8) as a starting ground. Ultimately, the current proposal leads to new models in which promising therapeutic approaches for both diseases can be evaluated. Furthermore, the probes and imaging tools used in this proposal can be used for multiple purposes, which makes them ideal for future animal research or translation to human research for the clinic.

There are three main aims of the project with specific sub-aims.

Aim 1. Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

To achieve this aim, we have defined a set of sub-aims:

1.1. Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. In this aim, as well as the following aims, we intend to start the experiments when rats reach ± 11 weeks (adults). Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet (project proposal Figure 2) for ± 12 weeks that will raise plasma cholesterol levels. Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels (Figure 1).

1.2. Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to a chow diet with or without warfarin/vitamin K₁ for ± 12 weeks that will induce vessel calcifications (Figure 1).

1.3. Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet with or without warfarin/vitamin K₁ (project proposal Figure 2) for ± 12 weeks that will raise plasma cholesterol levels (only measured in WAG/Rij rats) and will induce vessel calcifications. Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels (Figure 1).

Within all sub-aims, the contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals will be measured during the last ± 3 weeks prior to imaging. Controls animals will also be measured from the different aims to compare the outcome data and will be measured simultaneously with the experimental animals (**Figure 2,3,4; project proposal**). We have selected several tests that will be performed, including: i) the Y-maze continuous alternation test (cognitive performance) ii) the object recognition test (cognitive performance) iii) the zero-maze test (anxiety-related behavior) iv) the sucrose preference test (anhedonia; a measure of depressive-like behavior) and v) the open field test. After these tests, imaging will be performed using specific PET/SPECT markers, e.g., ¹⁸F-NaF to visualize active mineralization, ¹⁸F-FDG to visualize inflammation, ¹⁸F-HX4 to visualize hypoxia, and ^{99m}Tc-AnnexinA5 to visualise apoptosis of the vessel wall. Finally, fluorescent markers will be injected including Annexin A5 (apoptosis), Fetuin-A (calcification), pimonidazole (hypoxia) and CCL5 (inflammation) before sacrifice.

Go/No-go decision aim 1: The group(s) of animals displaying no atherosclerotic plaques and/or calcification will not pass to aim 2 and 3.

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing CVD and cancer

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet with or without warfarin/vitamin K₁ (project proposal Figure 3) for ± 12 weeks that will raise plasma cholesterol levels and will induce vessel calcifications. Tumor growth will be induced by either implantation of a syngeneic rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats; week ~ 16) or injected with RK3E-ras cells (SD Apoe^{tm1sage} rats; week ~ 18) (Figure 2). Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol level measurements. The contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals and imaging procedures will be performed as described for aim 1.

Go/No-go decision aim 2: Only if a multi-morbidity model is accomplished, aim 3 will be performed to investigate the molecular mechanisms.

Aim 3. Study the underlying mechanisms between CVD and cancer

To achieve this aim, we have defined a set of sub-aims:

3.1. Study the underlying mechanisms between atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet (project proposal Figure 4) for ±12 weeks that will raise plasma cholesterol levels. Tumor growth will be induced by either implantation of a syngeneic rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats; week ~16) or injected with RK3E-ras cells (SD Apoe^{tm1sage} rats; week ~18) (Figure 3). Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels. The contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals and imaging procedures will be performed as described for aim 1. Combination of these markers will shed light on the molecular mechanisms involved of atherosclerosis and cancer.

3.2 Study the underlying mechanisms between calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to chow diet with or without warfarin/vitamin K₁ (project proposal Figure 4) for ±12 weeks that will induce vessel calcifications. Tumor growth will be induced by either implantation of a syngeneic rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats; week ~16) or injected with RK3E-ras cells (SD Apoe^{tm1sage} rats; week ~18) (Figure 3). Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels. The contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals and imaging procedures will be performed as described for aim 1. Combination of these markers will shed light on the molecular mechanisms involved of calcification and cancer.

Justification of outcome parameters

PET/SPECT/CT imaging

These non-invasive imaging techniques allow to quantify plaque formation, calcification, and tumor microenvironmental characteristics amongst others within one animal, thus minimizing the number of animals as compared to ex-vivo analysis. The following labels can be used in this pilot: ¹⁸F-NaF to visualize active mineralization, ¹⁸F-FDG to visualize inflammation and cancer metabolism, ¹⁸F-HX4 to visualize hypoxia in plaques and tumors, and ^{99m}Tc-AnnexinA5 to visualise apoptosis of the vessel wall. Finally, rats will be injected with fluorescently labelled Annexin A5 (apoptosis), Fetuin-A (calcification), pimonidazole (hypoxia) and CCL5 (inflammation) for intravital 2-photon microscopy confirmation.

Tumor growth

Quantitative in vivo analysis of tumor growth will be performed via caliper measurement as tumors grow subcutaneously in the flank to assess differences in tumor growth between the experimental groups.

Tumor microenvironment, immunological parameters and blood biomarkers

Changes in tumor microenvironment (hypoxia, vasculature etc.) and immunological parameters (immune cell tumor infiltration, memory markers, etc.) will be assessed by non-invasive imaging, immunohistochemical analysis and/or flow cytometry analysis of tumor and secondary lymphoid organs, which will allow us to understand the underlying mechanisms between CVD and cancer (multi-morbidity). In addition, blood will be collected at sacrifice for further in vivo analysis.

General clinical parameters:

Body weight loss, lack of grooming, altered response to stimuli can be a result of reduced food intake due to illness, tumor formation and/or treatment. Increased tissue weight (e.g., liver, spleen) may be associated with inflammation.

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

The following procedures will be conducted (the nature, frequency, route, etc. are summarized in Table 1):

1. *Tail vein vector injection*

Any compound will be administered according to its preferred route. When multiple administration routes are possible, the route resulting in the lowest discomfort will be chosen. For the virus administration, a single tail vein injection will be used.

2. *Western type diet (enriched/or not enriched with warfarin (VKA) and vitamin K₁)*

Rats will be fed for 12 weeks (high cholesterol diet (\pm VKA/vitamin K₁)).

3. *Blood sampling*

Blood sampling will be performed via the tail vein according the NC3R recommended guidelines.

Rationale: blood analysis will determine cholesterol levels in the blood which will show virus efficacy. Blood is drawn to a maximum of <10% of the circulating blood every 4 weeks.

4. *Subcutaneous injection of tumor cells*

Tumor cells will be administered via single SC injection.

5. *Subcutaneous implantation of tumor tissue fragments*

Surgery and subcutaneous inoculation of rhabdomyosarcoma R1 tumor pieces will be performed under isoflurane anesthesia as previously described (9). Pre- and postsurgery analgesia will be applied. Based on our experience tumors reach required imaging volume between 3 and 5 weeks after inoculation.

Rationale: subcutaneous induction of the tumors allows precise and accurate monitoring of the tumor growth, while being a relevant model of human cancer.

6. *Compound injection*

Any compound will be administered according to its preferred route. When multiple administration routes are possible, the route resulting in the lowest discomfort will be chosen, in this case via single IP (fluorescent imaging probes) or single IV (radiotracer probes) injections (10).

7. *PET/SPECT/CT imaging (studying plaque and tumor characteristics)*

PET/SPECT/CT imaging will be performed at one time point per probe upon isoflurane anesthesia to obtain imaging information on plaque formation on disease progression and characteristics. Imaging takes approximately 15 minutes and will be done while the animal is under isoflurane anesthesia. Afterwards, animals will be monitored for the recovery from anesthesia.

Rationale: Imaging allows non-invasive longitudinal evaluation of disease progression and its characteristics. In contrast to ex-vivo analysis, this approach provides multiple probes in one animal, reducing the number of animals used.

8. *Cognition and affect-related behavioral testing*

Y-maze continuous alternation test

Animals will be exposed to a Y-shaped maze during the dark phase for five minutes, with continuous access to all three arms of the maze. Working memory will be determined by assessing novel arm entries.

Object recognition test

Animals will be habituated to a circular arena prior to testing. During testing, the mouse is presented with two similar objects during the first session (T1), and then one of the two objects is replaced by a new object during a second session (T2). The amount of time taken to explore the new object provides an index of recognition memory. Individual session last 4 minutes each. Intervals between trials will vary depending on baseline performance (usually, 1, 2, 4 and 24h).

Sucrose preference test

Animals will be given access to 2 bottles, one containing normal water and one containing 1% sucrose, for 6h. To prevent location bias, bottles will be switched 3h post-challenge. Total sucrose water intake (mL) and sucrose preference (volume [sucrose water]/volume[sucrose + normal water] × 100) will be determined. Anhedonia is defined as a relative lack of preference for the sucrose solution.

Elevated zero maze

During the elevated zero maze test, animals will be allowed to explore a circular arena consisting of two open and two closed arms/compartments for 5 minutes. Anxiety is measured by the relative amount of time spent in the closed arms, while time spent in the open arms is indicative of natural spontaneous exploratory behavior.

Open Field

A simple sensorimotor test used to determine general activity levels, gross locomotor activity, and exploration habits in rodents. For this purpose, animals will be allowed to freely explore to a square arena for 20 minutes.

Rationale: These five, relatively non-invasive tests will allow us to assess the effects of multi-morbidity on mental health and vice versa.

9. *2-photon intravital microscopy*

2-photon intravital microscopy will be performed at end point with relevant probes upon isoflurane anesthesia to obtain microscopic information on plaque/tumor formation on disease progression and characteristics. Afterwards, animals will be euthanized according to the guidelines (point 10).

Rationale: Imaging allows specific evaluation of disease progression and its characteristics. In contrast to ex-vivo analysis, this approach provides multiple probes in one animal, reducing the number of animals used.

10. *Killing of the animals*

The animals will be euthanized according to the guidelines 1) in the end of the experiment to obtain relevant organs for the ex-vivo analysis, 2) if humane endpoint is reached.

Rationale: At the end of the experiments blood (vena cava), urine, and/or tumors and/or other tissues (carotids, aortic arch, heart, kidneys, spleen, liver, lungs, sternum, tibia, trachea, and brains) will have to be collected for extensive analysis. It is justified by the necessity to analyze the excised tissues in order to identify the prognostic/predictive biomarkers of tumor response as well as investigate the underlying mechanisms of tumor response.

Estimated is that upon injection, it takes up to 3-5 weeks to have tumor take and a volume to start imaging. Overall, the longest period an animal is in experiment is estimated to be 3 months.

Table 1: Overview of animal procedures, nature, frequency, and duration of each procedure (SC-subcutaneous; IV-intravenously; IP-intraperitoneally)

Animal procedure	Nature (goal)	Route/Frequency	Duration
1. Tail vein injection	Boosting PCSK9 expression	Tail vein, max 1x	max 1 min
2. Western type diet	Increasing plasma cholesterol Inducing atherosclerosis (plaque build-up)	Food pellets/ continuous	± 3 months
3. Blood sampling	Response biomarker (all groups)	Tail vein, max 5x (before virus)	2 min

		injection, during and at sacrifice)	
4. Subcutaneous injection of tumor cells (SD Apoe^{tm1sage} rats)	Establishing tumor	S.C. flank, max 1x	max 1 min
5. Subcutaneous implantation of tumor tissue fragments (Wag/Rij rats)	Establishing tumor	S.C. flank, max 1x	max 5 min
6. Probe injection	Measuring disease progression and characteristics	max 12x I.P.	max 1 min
7. PET/SPECT/CT imaging	Measuring disease progression and characteristics	max 12x I.V.	max 45 min
8. Cognition and effect-related behavioral testing			
Y-maze continuous alteration test	Cognitive assessment	1x	max 10 min
Object recognition test	Cognitive assessment	Maximally 4 inter-trial intervals next to training, dependent on performance	1 week training, 4 min each trial (2 trials/interval)
Sucrose intake test	Anhedonia test	Training, followed by 3 tests (once weekly)	6 hrs/test day
Elevated zero test	Anxiety test	1x	5 min
Open field	Locomotor behavior	1x	20 min
9. 2-photon intravital microscopy	Measuring disease progression and characteristics	1x	±3 hours
10. Killing of the animals	Response biomarker (all groups)	1x	up to 3 min

Two tumor cell types, which are well characterized, relatively easy to operate and to follow-up were selected based on our own data and/or data of collaborators or reported by the others with regard to rat strain, microenvironmental characteristics of the tumors and formation of primary tumors. Metastasis formation has not been observed for these models at a primary tumor volume at moment of imaging. In order to establish a multi-morbidity model and study the underlying mechanisms between CVD and cancer, rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats) and RK3E-ras (SD Apoe^{tm1sage}) cell types are required.

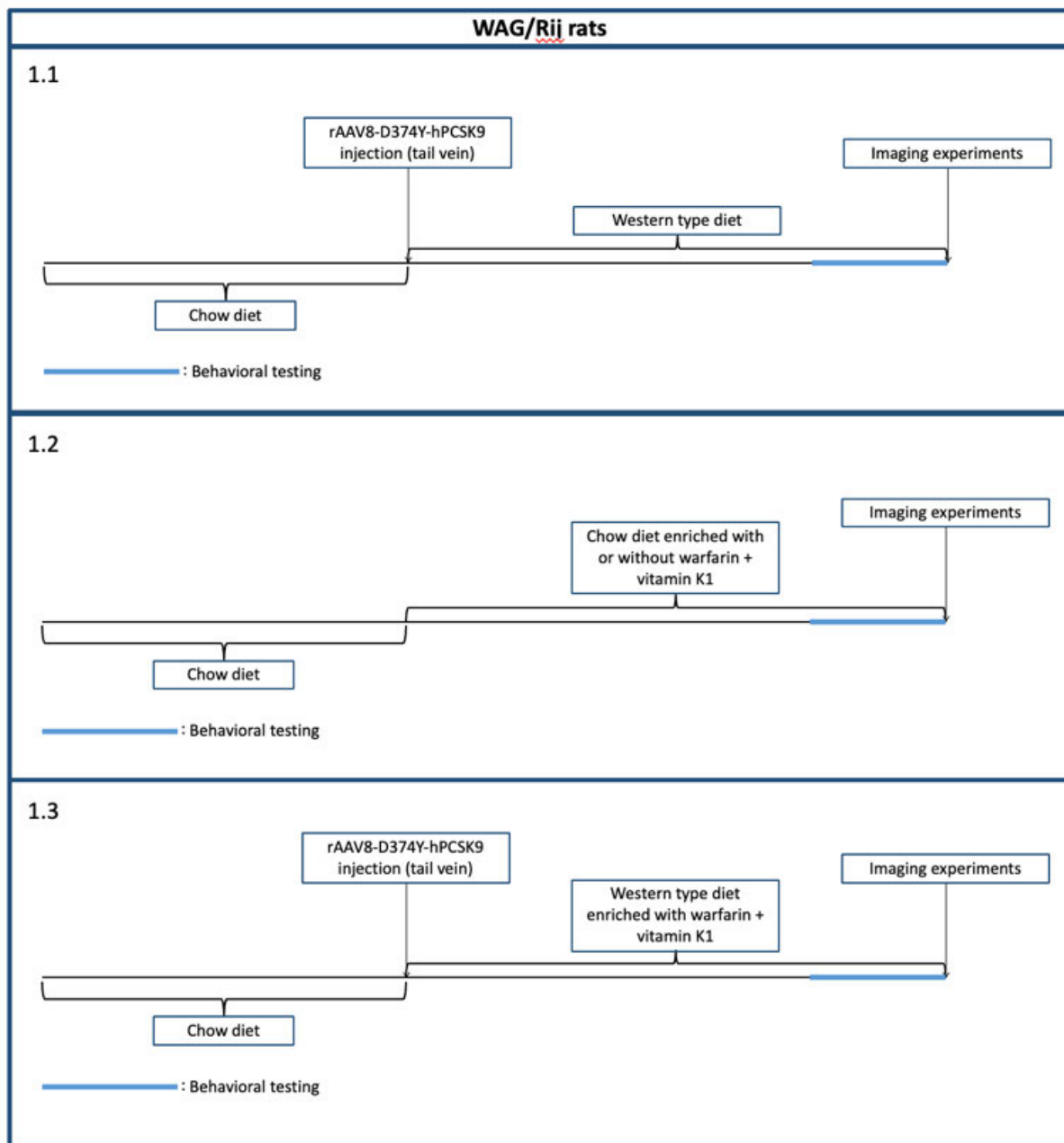


Figure 1: Overview of the timeline with WAG/Rij rats of aim 1. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

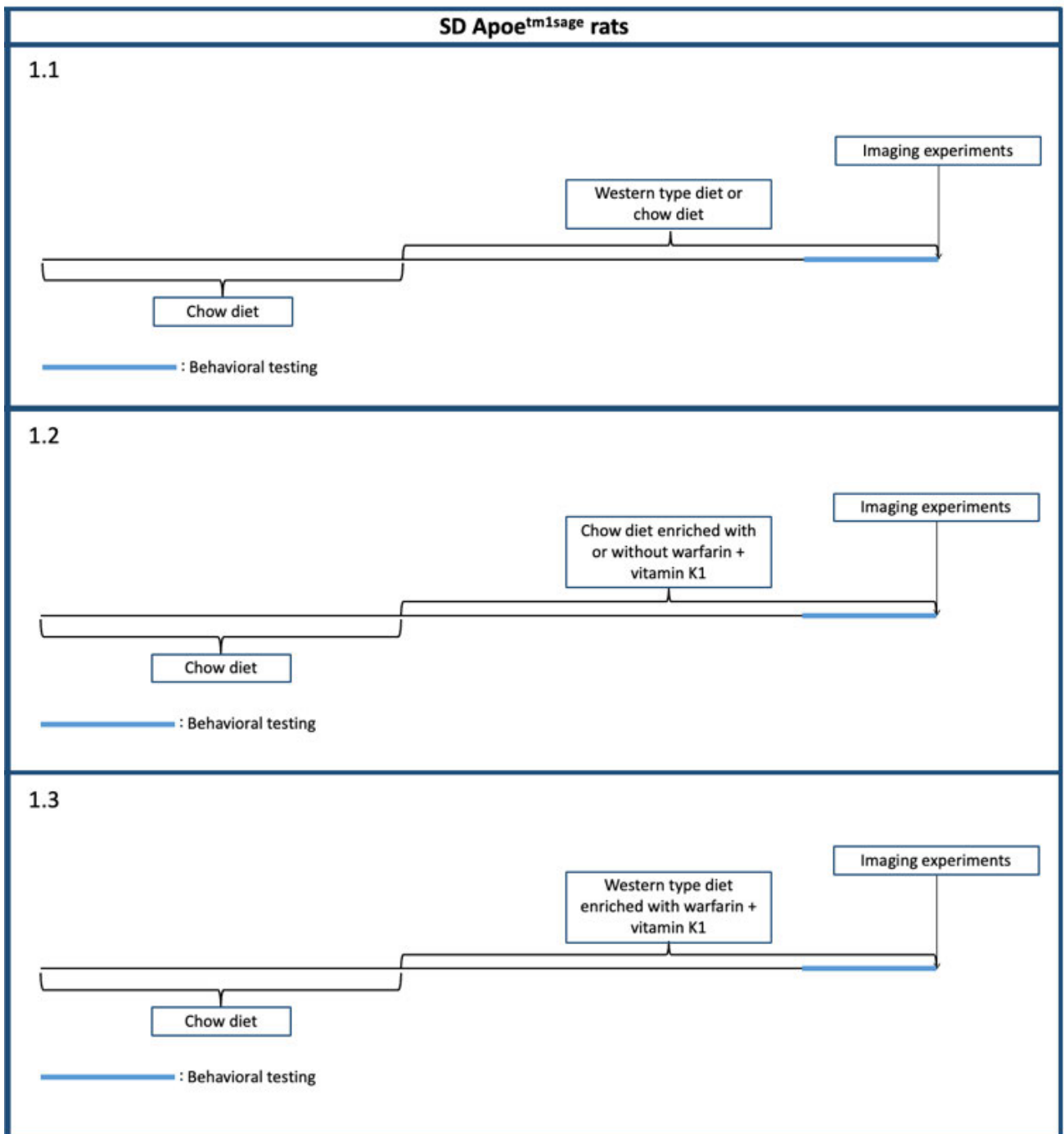


Figure 2: Overview of the timeline with SD Apo^{tm1sage} rats of aim 1. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

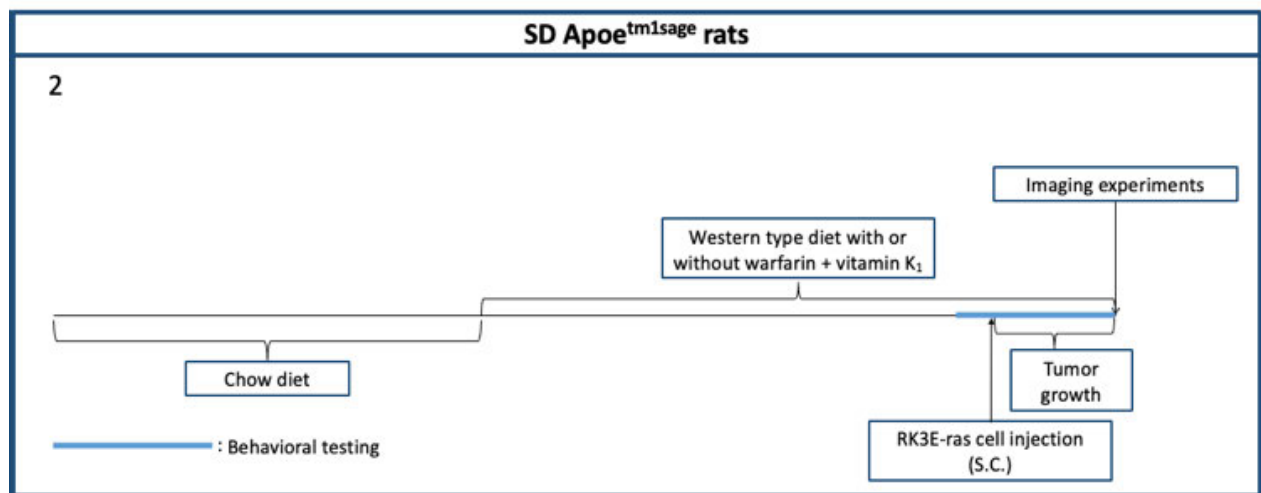
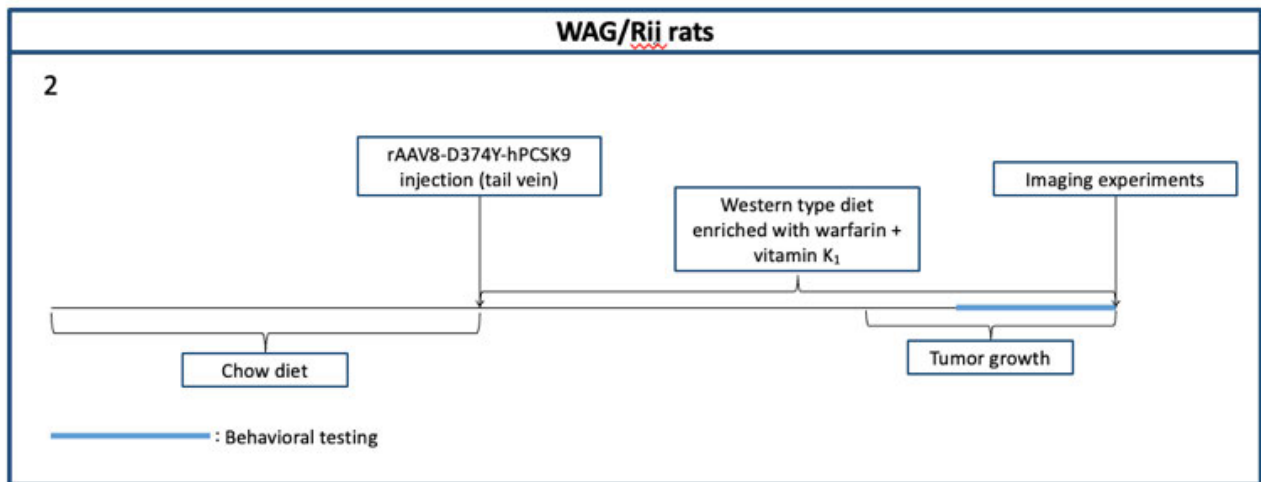


Figure 3: Overview of the timeline of aim 2. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

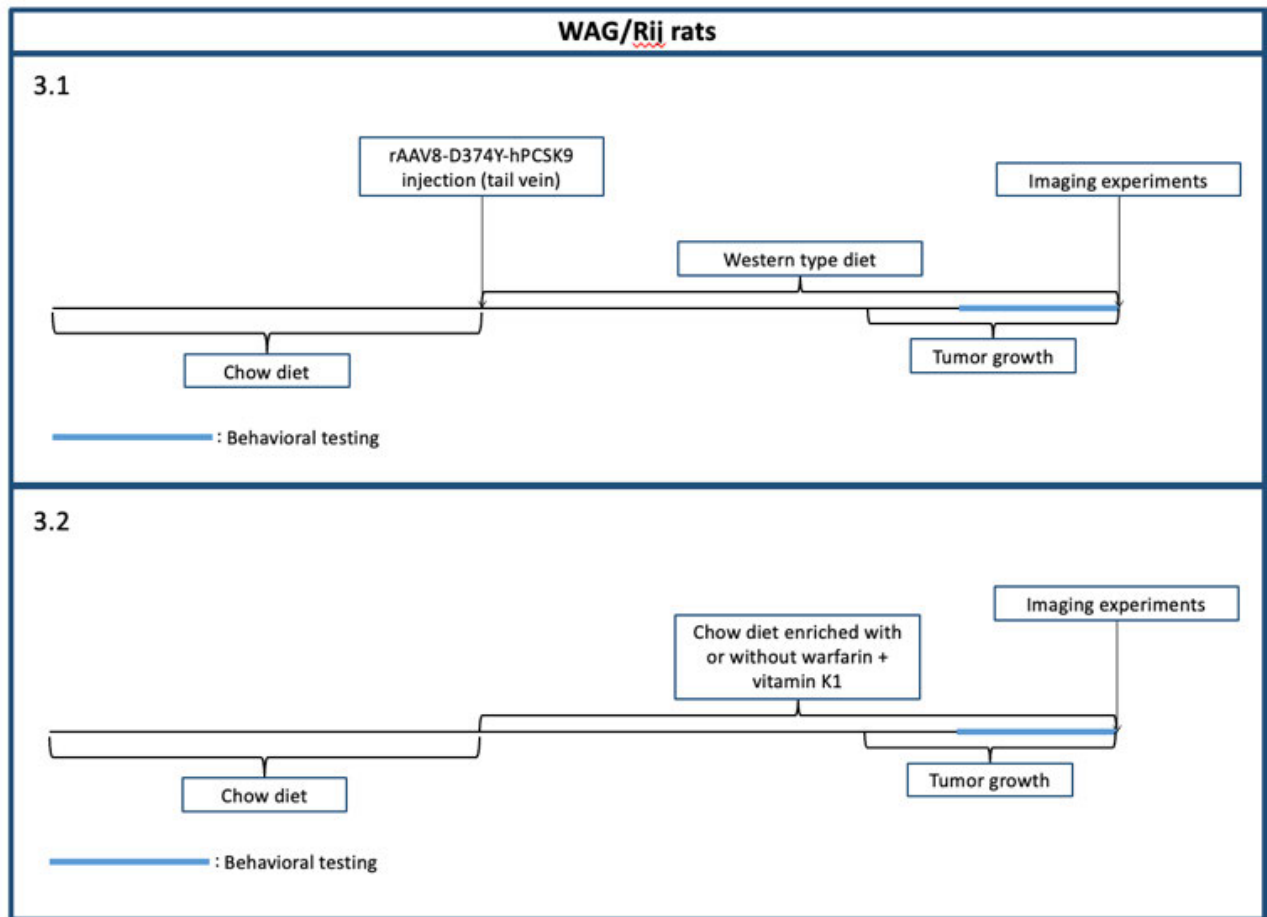


Figure 4: Overview of the timeline with WAG/Rij rats of aim 3. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

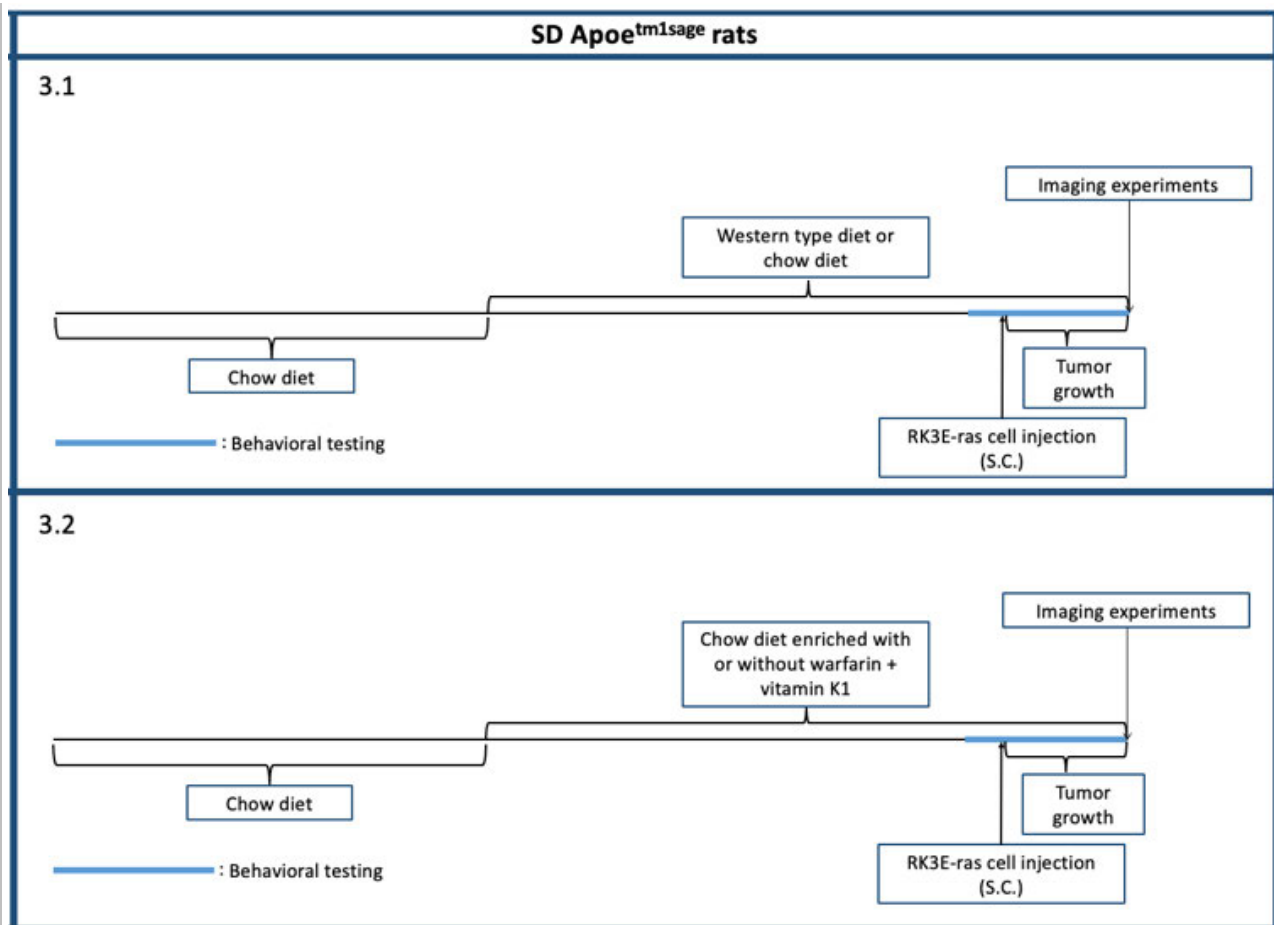


Figure 5: Overview of the timeline with SD Apo $\epsilon^{tm1sage}$ rats of aim 3. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

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

Prior to executing an experiment, we perform statistical analysis (power analysis) to ensure that we use the minimum number of animals per group to detect meaningful differences in outcomes. G*power software is used for sample size calculations. To compare the differences between 2 groups (experimental vs control), we will use a t-test (Means: difference between two independent means, two-tails), A priori: compute required sample size given an $\alpha = 0.05$, power 0.80 and effect size. For each experimental group, we correct this number also for drop-out (10% for all aims, e.g., no tumor formation) and rounded up the final number only at the end. Values for effect size (d/s , where d = difference, s = variance, see page 9) will be based on literature and own experience (9, 11-13).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rat	Licensed breeding facility	adult	230	both	yes	SD Apo $\epsilon^{tm1sage}$

2	Rat	Licensed breeding facility	adult	230	both	no	Wag/Rij
---	-----	----------------------------	-------	-----	------	----	---------

Provide justifications for these choices

Species	We will use laboratory rats to achieve our goals. Our previous experience with these rat strains will reduce discomfort for the animals and enhance the accomplishment of a multi-morbidity model.
Origin	Licensed breeding facilities will be used to obtain laboratory rats.
Life stages	Adult rats (minimal 11 weeks old) will be used in particular to ensure maturation of the immune system and to reflect clinical situation.
Number	<p>We have estimated that we will require max 440 rats over entire period of the project. Specifically, for each aim see Table 2.</p> <p>We have calculated the number of animals based on previous experience and published literature by others. The number of animals per group (Aim1,2,3) (based on calculations with the formula above) will be n = 10 animals, taking into account d=30% and s=20%, with a power of 80%. In aim 1.3 and 3.2, we will use 60 rats in total instead of 80 rats, as aim 1.1 and 3.1 already contains the control animals for these aims (Table 2).</p>
Gender	For all experiments, both male and female animals will be used within this proposal since there is no evidence in literature of difference between sexes (completely new model).

Genetic alterations	Apoe is a genetic mutation.
Strain	SD Apoe ^{tm1sage} and WAG/Rij rats will be used for this pilot.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

In principle, all animal procedures may cause discomfort and it is expected that only some of them will be associated with acute pain (procedure 1, 2 and 3. All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used following to the GV-SOLAS guidelines ([http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Anaest. Analgesie/2021-04_Pain_Management_for_laboratory_animals.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Anaest._Analgesie/2021-04_Pain_Management_for_laboratory_animals.pdf)). These include the use of appropriate analgesia and anesthesia procedures whenever necessary. Appropriate pain reduction will be applied upon consultation with the responsible official. Follow-up of the animals will be done regularly, at least daily, to ensure rapid notifications of signs of discomfort. After experimental procedures, the animals will be followed up more frequently. Humane endpoints, as described below, will be strictly followed.

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

- 1) Western type diet has been reported to induce skin irritations (xanthomas) in Apoe^{-/-} and LDLr^{-/-} mice. This may also be the case in rats displaying dyslipidemia.
- 2) Stress due to IV vector injections.
- 3) Stress due to anesthesia for imaging purposes.
- 4) Internal bleedings due to warfarin diet.
- 5) Tumor growth might cause tight skin (during subcutaneous growth).
- 6) Surgery can cause infections, although with very low incidence, at the site of the wound.
- 7) Stress related to behavioral testing will be accompanied with mild discomfort.

Explain why these effects may emerge.

- 1) Xanthomas: age, environmental factors, diet, age at weaning and gender.
- 2) Stress during IV injections can be due to inadequate habituation.
- 3) Stress during insertion of IV catheters can result from incidental animal handling.
- 4) Internal bleedings: previous experience has shown that animals fed a warfarin-enriched diet may develop internal bleedings. The bleedings are likely due to the anticoagulant effects of warfarin.
- 5) During tumor growth normal tissues might not be able to keep up which could e.g. cause tightness of skin during subcutaneous growth.
- 6) Surgery requires the skin to be cut and sutured.
- 7) Stress related to behavioral testing can be due to the aspect of novelty.

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

- 1) Xanthomas: whether xanthomas formation will also be observed in rats in which atherosclerosis is induced by PCSK9 vector injections combined with western type diet remains to be established. However, it should be noted that 1) xanthomas generally developed in elderly rats (in contrast, we will be using relatively young rats) and 2) the reported increase in plasma cholesterol in PCSK9 vector injected mice is relatively mild (in comparison to values observed in LDLr^{-/-} mice). In addition, the rats will be carefully and individually checked for any signs of distress throughout the diet period.
- 2) In order to minimize stress during tail vein injections, the rats will be habituated to the researchers performing the experiments before the start of the protocols.
- 3) In order to minimize stress related to insertion of IV catheters only experienced personal will be working with the rats.
- 4) In order to minimize the change of internal bleedings due to the anticoagulant effects of warfarin, the food of the rats will be supplemented with vitamin K1 (concentrations to be measured by RP-HPLC). In addition, the rats will be carefully monitored.
- 5) In case of issues due to tumor growth, we will take measures accordingly (e.g., sacrifice the rat when humane endpoints are met).
- 6) Surgery will be done aseptically, and antibiotics will be applied whenever necessary.
- 7) In order to minimize stress during behavioral testing, the rats will be habituated to the researchers performing the experiments before the start of the protocols.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

Animals will be monitored at least daily for signs of discomfort. In consultation of the IVD an action table will be defined which includes actions to be taken at specific predefined clinical scores on welfare related criteria and based on which observations HEP's should be applied. Clinical signs of pain, discomfort (general malaise) and stress will be assessed based on clinical signs of awareness, posture, motivation to perform normal species-specific behaviour, social interaction, reaction when handled, facial expression, gait, body condition, bodyweight, coat condition, porphyria, breathing pattern, colour mucosa, faeces, and animal model specific criteria such as tumor development and size, skin lesions.

HEP will be based on:

1. Acute bodyweight loss (> 15 % weight loss in 1-2 days) or progressive bodyweight loss before reaching 20% weight loss. Corrections will be included for tumour growth.
2. Tumor growth interfering with normal behaviour or locomotion.
3. Tumor growth associated with pain, which cannot be alleviated with analgesic treatment.
4. Tumor growth associated alternations in overlying skin structure, e.g., necrosis preceding skin break through
5. Tumor size of more than 15 cm³
6. Anaemia as indicated by symptoms such as pale feet, ears or mucosa, or haematological measures
Coagulation problems after injections resulting in hematoma formation or prolonged bleedings (unstoppable)
7. Failure to eat or drink over a 24h period resulting in dehydration
8. Bloodstained or mucopurulent discharge from any orifice
9. Laboured respiration
10. Nasal discharge and/or cyanosis
11. Diarrhoea (soft faeces) over a 48-h period

Indicate the likely incidence.

The incidence that one of these parameters, leading to a HEP, will occur is less than 10%. The animals will be well monitored by experienced people and will aim to avoid reaching these humane endpoints. Frequent follow-up of the animals will allow timely interventions to minimize these.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Cumulative exposure and discomfort for the different groups are schematically represented in **Table 2** and **3**. As indicated for each aim, the cumulative discomfort is estimated to be the same for all animals for each specific aim independent of treatment group since control animals will undergo the same procedures (vehicle administration, sham irradiation). Also, the anticipated maximal number of animals per group/discomfort is listed (see section B).

The following procedures have been identified:

Experimental animals:

Establishment of an multimorbidity model						
Group	Aim	purpose	treatment groups	# animals	discomfort	Animal procedures
1	1.1	Establishment of atherosclerosis	WAG/Rij * AAV8 * WTD * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
2			WAG/Rij * saline (control) * WTD * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
3			SD-Apoe * WTD * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
4			SD-Apoe * CD (control) * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
5	1.2	Establishment of calcification	WAG/Rij * CDK * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10
6			WAG/Rij * CD (control) * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10
7			SD-Apoe * CDK * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10
8			SD-Apoe * CD (control) * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10
9	1.3	Establishment of CVD	WAG/Rij * AAV8 * WTDK * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
10			WAG/Rij * saline (control) * WTDK * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
11			SD-Apoe * WTDK * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
12						
13	2	Establishment of multimorbidity	WAG/Rij * AAV8 * WTDK * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
14			WAG/Rij * saline (control) * WTDK * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
15			SD-Apoe * WTDK * RK3E * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
16			SD-Apoe * WTD * RK3E * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
17	3.1	Study the underlying mechanisms between atherosclerosis and cancer	WAG/Rij * AAV8 * WTD * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
18			WAG/Rij * saline (control) * WTD * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
19			SD-Apoe * WTD * RK3E * 10 animals * 2 sex	20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
20			SD-Apoe * CD * RK3E * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
21	3.2	Study the underlying mechanisms between vascular calcification and cancer	WAG/Rij * CDK * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
22			WAG/Rij * CD * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
23			SD-Apoe * CDK * RK3E * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
24						
Total # rats				440		

AAV8: injection of AAV8 vector expression PCSK9
WTD: western type diet
WTDK: western type diet with warfarin + vitamin K1
CD: chow diet
CDK: chow diet with warfarin + vitamin K1
RK3E: injection of RK3E-ras cells
RAB: implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas

Cumulative the experiment is classified as moderate (100% of all rats).

Animals may also suffer from local transportation (mild) back forward to the imaging facilities.

The mentioned procedures will be used in evaluation of the defined research questions. Animals may be randomly assigned to control or treatment groups and treated as listed in **Table 2**. Anticipated total discomfort scores are based on previous experience and guidelines.

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	Due to the complexity of the pathologies studied (atherosclerosis, cancer and vascular calcification) it is currently not possible to use <i>in vitro</i> alternatives when studying these pathologies separately. The current proposal aims to investigate how these different pathologies influence each other by establishing an animal model for multi-morbidity by combining the above-mentioned pathologies. Hence, we can only use an <i>in vivo</i> approach. The proposed studies including ex vivo validation and uptake of imaging agents in organs such as tumor, vessels, and brain cannot be performed in humans.
-------------	---

Reduction	The design of the experiments and the stepwise procedure being followed between the different objectives, allows us to reduce the number of animals significantly. We have put in place strict go/no-go decisions for efficacy evaluation experiments: when these criteria are not met, further experiments will not be performed (Figure 2 and 3 of the proposal). Furthermore, we aim to combine several outcome parameters (e.g. <i>in vivo</i> imaging followed by <i>ex vivo</i> imaging) in order to use the animals as efficiently as possible to lower animal numbers.
Refinement	We have extensive experience with animal models for atherosclerosis, vascular calcification and cancer, and the required methods, regarding the pathologies that will be studied (atherosclerosis, vascular calcification, and cancer). Our previous practical experience in mice and rats will allow us to reduce discomfort as much as possible. Invasive techniques will be performed by experienced well qualified personnel. Studying cognition and affect will allow for more insight into possible adverse effects for the animals and will allow redesigning future experiments taking into account animal welfare.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

NA

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

After the initial *in vivo* imaging, *ex vivo* imaging techniques will be applied and blood and urine will be collected for further analyses. These techniques cannot be applied in a living animal.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Anaesthetic overdose (if blood via heart puncture will be collected)

The killing of animals will be completed by one of the recommended methods according to the guidelines.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

References:

1. Bjorklund MM, Hollensen AK, Hagensen MK, Dagnaes-Hansen F, Christoffersen C, Mikkelsen JG, et al. Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering. *Circ Res*. 2014;114(11):1684-9.
2. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, and Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(24):7734-8.
3. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffers PM, DeMey JG, and Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*. 2007;109(7):2823-31.
4. Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Thijssen HH, De Mey JG, and Vermeer C. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. *J Vasc Res*. 2003;40(6):531-7.
5. Barendsen GW, and Broerse JJ. Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV x-rays. I. Effects of single exposures. *Eur J Cancer*. 1969;5(4):373-91.
6. Dubois L, Landuyt W, Haustermans K, Dupont P, Bormans G, Vermaelen P, et al. Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [(18)F]fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. *Br J Cancer*. 2004;91(11):1947-54.
7. Rune I, Rolin B, Lykkesfeldt J, Nielsen DS, Krych L, Kanter JE, et al. Long-term Western diet fed apolipoprotein E-deficient rats exhibit only modest early atherosclerotic characteristics. *Sci Rep*. 2018;8(1):5416.
8. Kim SA, Kim HW, Kim DK, Kim SG, Park JC, Kang DW, et al. Rapid induction of malignant tumor in Sprague-Dawley rats by injection of RK3E-ras cells. *Cancer Lett*. 2006;235(1):53-9.
9. Shiraishi Y, Xu C, Yang J, Komaki R, and Lin SH. Dosimetric comparison to the heart and cardiac substructure in a large cohort of esophageal cancer patients treated with proton beam therapy or Intensity-modulated radiation therapy. *Radiother Oncol*. 2017;125(1):48-54.
10. Dubois LJ, Lieuwes NG, Janssen MH, Peeters WJ, Windhorst AD, Walsh JC, et al. Preclinical evaluation and validation of [18F]HX4, a promising hypoxia marker for PET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(35):14620-5.

11. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(24):5469-79.
12. Kruger T, Oelenberg S, Kaesler N, Schurgers LJ, van de Sandt AM, Boor P, et al. Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(11):2618-24.
13. van Gorp RH, Dijkgraaf I, Broker V, Bauwens M, Leenders P, Jennen D, et al. Off-target effects of oral anticoagulants - vascular effects of vitamin K antagonist and non-vitamin K antagonist oral anticoagulant dabigatran etexilate. *J Thromb Haemost.* 2021;19(5):1348-63.

Naam van het project	Opzetten van een multi-modaal diermodel met hart- en vaatziekten en kanker met mentale gezondheidsklachten
NTS-identificatiecode	NTS-NL-534025 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	multimorbiditeit rat beeldvorming chronische ziekten mentale gezondheid
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Multisystemisch

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Het doel van dit experiment is het opzetten van een nieuw diermodel waarin atherosclerosis, vaatverkalking en kanker gecombineerd worden, multimorbiditeit, in een of beide rattenlijnen (WAG/Rij of Apoe), wanneer beide succesvol. Hierbij om te bestuderen of ziekteprocessen als bijv. atherosclerosis, vaatverkalking en kanker zich anders ontwikkelen als er reeds een combinatie van deze pathologieën aanwezig is (multi-morbiditeit). Hiermee kunnen onderliggende mechanismen aan het licht gebracht worden voor onderzoeksdoeleinden. Daarbij zal worden gekeken naar de invloed van deze ziektes op mentale gezondheid.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>Dit project zal leiden tot een rat model voor multi-morbiditeit waarin relaties tussen verschillende pathologieën bestudeerd kunnen worden met behulp van multi-modale beeldvormende technieken. Een dergelijk model is van maatschappelijk belang omdat het kan leiden tot besparingen in de zorgkosten. Immers, door de huidige vergrijzing zijn er steeds meer multi-morbide patiënten die substantieel bijdragen aan de zorgkosten. Door middel van het op te zetten model kunnen onderliggende relaties bestudeerd worden om zo, op termijn, patiënten beter te kunnen behandelen naar aanleiding van eventuele nieuwe inzichten</p> <p>Op het moment dat het model voor multi-morbiditeit eenmaal opgezet is zal het in toekomstige experimenten gebruikt kunnen worden om vraagstellingen te beantwoorden die wel relevant zijn voor behandeling van patiënten maar waar op dit moment geen onderzoek naar gedaan wordt. Hierbij valt bijvoorbeeld te denken aan vragen als: Wat is de invloed van statines (standaardbehandeling bij hart-en-vaatziekten) op kanker? Hoe beïnvloeden cytostatica vaatverkalking?</p>

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De ratten zullen krijgen een westers type dieet met/zonder vitamine K wat kan leiden tot huidirritaties en bloedingen waaraan het dier zou kunnen sterven. Deze bloedverdunner wordt veelvuldig in de kliniek voorgeschreven aan patiënten met een verhoogde stollingsneiging. Om deze eventuele bloedingen zo veel mogelijk te beperken krijgen de dieren extra vitamine K1 toegediend dit om de bloedstolling te verbeteren. Verder zal het injecteren van de dieren in licht ongerief resulteren. Het induceren van de tumor kan leiden tot huidirritatie en infecties wat ongerief wat veroorzaken. De verschillende testen (beeldvorming en mentale gezondheidstesten) kunnen zorgen voor stress van de ratten.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Huidirritaties door hoog cholesterol dieet 2) Stress door IV injecties 3) Stress door anesthesie voor beeldvorming 4) Interne bloedingen door warfarine dieet 5) Tumor ontwikkeling kan huidirritaties veroorzaken 6) De implantatie van tumorcellen kan infecties veroorzaken, ook al is deze kans heel klein, aan de kant van de wond 7) Stress door gedragstesten 																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratten (Rattus norvegicus)</td> <td>440</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>440</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Ratten (Rattus norvegicus)	440	0	0	440	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Ratten (Rattus norvegicus)	440	0	0	440	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren worden gedood aan het einde van het experiment ten behoeve van het verzamelen van de organen voor verdere analyses</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

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

Specifiek zal er een model opgezet worden dat atherosclerose, vaatverkalking, en kanker in een ratmodel combineert. Deze ziektebeelden zijn allen multifactorieel, bij atherosclerose en tumorgroei is er bijvoorbeeld een duidelijke rol voor ontstekingscellen. Aanvullend zullen deze ziektebeelden ook los van elkaar bestudeerd worden, bijvoorbeeld atherosclerose met kanker, dit is alleen mogelijk in een diermodel waarbij deze ziektebeelden uit elkaar kunnen worden getrokken. Deze punten tezamen genomen maken het niet mogelijk om multi-morbiditeit met behulp van proefdiervrije alternatieven te bestuderen zoals celweek of patiënten; vervanging is dus niet mogelijk.

2. Vermindering

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

Om het totaal aantal dieren te verminderen zal met behulp van statistiek nagegaan worden wat de minimale groepsgroottes zijn. Daarnaast zal er tijdens go/no-go beslissingen nagegaan worden of er duidelijke redenen zijn om met één van beide rattenlijnen door te gaan.

3. Verfijning

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

Om ongerief zoveel mogelijk te beperken is ervoor gekozen de experimenten te stoppen voordat de hoge cholesterolwaarden in het bloed zullen leiden tot formatie van vetophopingen in de huid. Om te voorkomen dat bloedverdunners, die nodig zijn om vaatverkalking te induceren, kunnen leiden tot inwendige bloedingen zullen de ratten tegelijkertijd blootgesteld worden aan vitamine K. Om ongerief door de tumoren zo veel mogelijk te voorkomen zullen de ratten worden geëuthanaseerd voordat het tumor volume te groot wordt.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We gebruiken volwassen ratten van twee soorten species, waarbij we zowel mannelijke als vrouwelijk ratten meenemen. De rat is voor deze studies de meest geschikte diersoort, niet alleen omwille van de combinatie hart- en vaatziekten met kanker waarbij de tijd om kanker te ontwikkelen zodanig snel zal zijn in vergelijking met hart- en vaatziekten dat dit tijdframe niet past in de muis, maar ook omwille van de imaging procedures die gebruikt worden in deze studies waarbij kleine formaties van hart- en vaatziekten in beeld kunnen worden gebracht.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

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

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: donderdag 14 juli 2022 13:18
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216259
Bijlagen: PV2022_003_5.1 lid2e_ProjectProposal_lvD.pdf; PV2022_003_5.1 lid2e_NTS_lvD.xlsx; PV2022_003_5.1 lid2e_Aanvraag_lvD.docx.pdf; PV2022_003_5.1 lid2e_Appendix_lvD.pdf

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202216259.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 14-07-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 14-07-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

5.1 lid2h Advies PV 2022-003- AVD 5.1 lid2h 202216259; 5.1 lid2e

Preambule

De 5.1 lid2h verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de 5.1 lid2h via een beveiligde verbinding.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 5.1 lid2h
2. **Titel van het project:** Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health
3. **Titel van de NTS:** Opzetten van een dieronderzoek dat zich richt op de combinatie van vaatziekten en kanker, en de invloed daarvan op mentale gezondheid?
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:** 5.1 lid2h, contactpersoon: 5.1 lid2e
5.1 lid2h, emailadres: 5.1 lid2h
6. **Adviestraject (data dd-mm-jjjj):**

<input checked="" type="checkbox"/> ontvangen door DEC	14.07.2022
<input checked="" type="checkbox"/> aanvraag compleet	14.07.2022
<input checked="" type="checkbox"/> in vergadering besproken	22.07.2022
<input type="checkbox"/> anderszins behandeld	
<input checked="" type="checkbox"/> termijnonderbreking(en)	27.07.2022 t/m 28.10.2022 02.11.2022 t/m 05.12.2022
<input type="checkbox"/> besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen	
<input checked="" type="checkbox"/> aanpassing aanvraag	
<input checked="" type="checkbox"/> advies aan CCD	05.12.2022
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. **Eventueel horen van aanvrager:**
 - **Datum:** 28.10.2022
 - **Plaats:** 5.1 lid2h
 - **Aantal aanwezige DEC-leden:** 5
 - **Aanwezige (namens) aanvrager:** 4
 - **Gestelde vraag / vragen:** Zie bijlage III
 - **Verstrekt(e) antwoord(en):** Zie bijlage III
 - **Het horen van de aanvrager heeft wel geleid tot aanpassing van de aanvraag:**

9. Correspondentie met de aanvrager:

- **Datum:** 27.07.2022 en 02.11.2022
- **Gestelde vraag/vragen:** Zie bijlage I, II en III
- **Datum antwoord:** 20.10.2022 en 05.12.2022
- **Verstrekt(e) antwoord(en):** Zie bijlage I, II en III
- **De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag:**

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.** JA, twee leden van de **5.1 lid2h** zijn tijdens de behandeling van deze aanvraag verschoond geweest daar zij mede-aanvrager zijn.

C. Beoordeling (inhoud)

- 1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft** (Zie bijlage I handreiking 'Invulling definitie project volgens de versie 2022'; zie bijlage III voor CCD-toelichting en voorbeeld).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het doel is namelijk het ontwikkelen van een model op basis van de diersoort rat waarin een tweetal chronische aandoeningen simultaan tot uitdrukking komen. Aldus kan de interactie van beide chronische aandoeningen worden bestudeerd zowel wat betreft biologische als moleculaire mechanismen. Gekozen is voor de combinatie van atherosclerose/ vaatverkalking en kanker bij zogenoemde WAG/Rij en SD-Apoetm1sage ratten. Er is geopteerd voor een tweetal verschillende vormen van kanker te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen en een renale neoplasie (op basis van RK3E-ras). In dit fundamentele onderzoeksproject is modelontwikkeling een belangrijk doel naast bestudering van het onderliggende mechanisme van co-morbiditeit. De ontwikkeling van het model van co-morbiditeit zal sequentieel worden uitgevoerd. Deze projectaanvraag moet gezien worden als een eerste aanzet om de rol van mentale gezondheid in deze context te bestuderen, maar de nadruk ligt op het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Het project lijkt de meeste kenmerken te hebben van voorbeeld 3A uit de Handreiking 'Invulling definitie project'. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De **5.1 lid2h** vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de **5.1 lid2h** van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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

Voor zover de 5.1 lid2h de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten.

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

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek daar vooralsnog enkel onderliggende mechanismen van co-morbiditeit bestudeerd zullen worden en (potentieel therapeutische) interventies (nog) niet opportuun zijn.

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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK' : Stap 1.C4; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

Het directe doel van het project is het verkrijgen van een model van co-morbiditeit [teneinde de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen] met de diersoort rat als uitgangspunt. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit. Het betreft hier een fundamenteel project.

Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De 5.1 lid2h acht het niet denkbeeldig dat het uiteindelijke doel niet behaald zal worden.

De aanvrager heeft voldoende helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn, maar er wordt nog een literatuurstudie uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit op dit moment beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelings- en diagnostische mogelijkheden en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. De 5.1 lid2h is van mening dat het directe doel [het verkrijgen van een model van co-morbiditeit met de diersoort rat als uitgangspunt] gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op het verkrijgen van een model van co-morbiditeit met de diersoort rat als uitgangspunt alsmede inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit zijn de proefdieren en de onderzoekers.

De fundamentele waarde van leven zal de dieren in het kader van voorgesteld onderzoek ontnomen worden. Daarnaast zullen de dieren aangetast worden in hun

integriteit en mogelijkheid tot uitoefening van soorteigen gedrag door de experimentele handelingen [*voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puncturing van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken en gedragstesten*] en het leven met de gevolgen daarvan, waaronder het ondervinden van ongerief gedurende de proeven.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden:

De onderzoeker zullen mogelijk kennis verkrijgen over de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit en daarover dan kunnen publiceren.

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

Voor zover de **5.1 lid2h** de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C5).

Voor zover de **5.1 lid2h** kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met vergelijkbare proefdiermodellen, de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als *Proc Natl Acad Sci USA, Circ Res, Nutrients, Int J Mol Sci* en *Nature*.

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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C6).

De **5.1 lid2h** is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker, maar sluit niet uit dat één van de gekozen rattenstammen (WAG/Rij ratten) in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling (deze staat bekend om inherente spontane epileptische aanvallen [met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit]). Bovendien blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose (ondermeer doi: 10.1155/2022/9311227, doi: 10.3390/ijms231911154 en doi: 10.1111/jfbc.14349) niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Opgemerkt dient te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immuunhistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslisstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de **5.1 lid2h** uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod) voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C1; zie bijlage III voor CCD toelichting en voorbeelden).

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

Niet van toepassing.

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 **5.1 lid2h** heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt C in de bijlage.

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

De **5.1 lid2h** acht het ongerief van alle betrokken dieren als cumulatief matig realistisch ingeschat, zoals nader gespecificeerd in tabel 2 in de bijlage.

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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C2). (zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen [voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puncturing van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken en gedragstesten], het leven met de gevolgen daarvan, beperking van hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van een aantal dieren wordt tevens aangetast door genetische modificatie (Apoe).

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage van maximaal 10 dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

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

De 5.1 lid2h is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt.

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h lijkt het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijk resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse met groei van de neoplasie als relevante uitleesparameter.

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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3).

De 5.1 lid2h heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de 5.1 lid2h onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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

Het betreft hier 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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren.

De 5.1 lid2h is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren.

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager, want de dieren worden gedood in het kader van de proef ten behoeve van postmortaal onderzoek van ondermeer het vaatstelsel en de neoplasië.

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

Niet van toepassing.

NTS

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 3.A).

Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering, het ongerief [*voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde punctering van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken en gedragstesten*] en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het cumulatief matig ongerief?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 3.B; zie bijlage III voor CCD-voorbeelden).

Onderstaande lijst is een suggestie, meestal zijn er minder belangengroepen:

- Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel
- Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.

De [5.1 lid2h](#) is van mening dat de belangen van onderzoekers/wetenschappelijke instituten, binnen het project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health] zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na cumulatief matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen [*voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde punctering van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken, gedragstesten en genetische modificatie*] en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verkrijgen van een model van co-morbiditeit met de diersoort rat als uitgangspunt alsmede inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit [de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker]. Dit onderzoek kan uiteindelijk mogelijk perspectief bieden op meer effectieve diagnostiek en therapieën van co-morbiditeit van chronische aandoeningen indien mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit inderdaad worden opgehelderd. Vandaar dat de [5.1 lid2h](#) het onderhavige onderzoek van reëel belang acht. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 3.C; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De meerderheid van de [5.1 lid2h](#) beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het reële voordeel voor onderzoekers/instituten' als bevestigend. De [5.1 lid2h](#) onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar meerderheidsmening weegt het reële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van onderzoekers/instituten, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering.

De [5.1 lid2h](#) is in meerderheid van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Opgemerkt dient echter te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immuunhistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslisstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen. Bovendien kan niet worden uitgesloten dat één van de gekozen rattenstammen in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling. Tevens blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de meerderheidsmening van de [5.1 lid2h](#) uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

De [5.1 lid2h](#) is ervan 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 [5.1 lid2h](#) is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt. Naar de mening van de [5.1 lid2h](#) is onderzoek naar co-morbiditeit van substantieel belang en is in het verlengde daarvan onderbouwd gebruik van proefdieren daarvoor niet uit te sluiten. Op grond van bovenstaande overwegingen beschouwt de [5.1 lid2h](#) in meerderheid de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" als ethisch gerechtvaardigd indien voorafgegaan door een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslisstrategie teneinde een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen. Derhalve voorziet de [5.1 lid2h](#) in meerderheid het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" van een positief advies met

voorwaarde.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten initieel een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslisstrategie.

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, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 4.A; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

Het uitgebrachte **5.1 lid2h** advies is met een **meerderheidsstandpunt** tot stand gekomen.

Het minderheidsstandpunt werd ingenomen op basis van de volgende twee argumenten:

- Het wordt in het onderhavige onderzoeksvorstel onvoldoende duidelijk gemaakt of onderzoek bij mensen niet meer voor de hand liggend is (zeker ten aanzien van mentale aspecten) en aldus ook van belang met het oog op reductie.
- Tevens vindt het betreffende lid de keuze voor de beide soorten nieuwvorming onvoldoende onderbouwd en geeft aan dat wil een model enige relevantie hebben voor uiteindelijke vertaling naar de mens er dan toch tenminste een veelvoorkomende vorm van nieuwvorming (die ook vaak leidt tot mentale effecten) bij mensen moet worden geselecteerd.

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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 4.B).

Zie voor de knelpunten onder D3.

Bijlage I:

Vragen 5.1 lid2h d.d. 27.07.2022 en Antwoorden VO d.d. 20.10.2022

Samenvatting

Chronische ziekten zorgen voor 71% van de overlijdens wereldwijd. Steeds meer patiënten laten een ziektebeeld zien waarbij meerdere ziekten samengaan, ook wel multimorbiditeit genoemd. Multimorbiditeit heeft negatieve effecten op sterftcijfers, ziekteprogressie, ziektestadium op het punt van diagnose, behandeling en/of uitkomst door de aanwezigheid van – vaak niet geweten - onderliggende chronische ziektes. Hart- en vaatziekten en kanker zijn de twee meest voorkomende chronische ziekten.

Vanuit klinische data is bekend dat overlevenden na kanker een verhoogde kans op hart- en vaatziekten en een 2-6 keer verhoogde kans om vroegtijdig te komen overlijden. De incidentie van kanker in atherosclerose patiënten is 3.1%; dit zijn omgerekend 58 miljoen patiënten wereldwijd (berekend op 2020). Onze huidige kennis is vooral bekend vanuit patiëntdata en gerelateerde associaties tussen verschillende ziektes. Hoewel we weten dat er een associatie bestaat tussen deze twee ziekten, worden interacties in het kader van morbiditeit en de consequenties van deze interacties op de behandeling op dit moment nog niet onderzocht in fundamenteel onderzoek.

De relevantie van dit projectvoorstel is de combinatie van een multimodaal model waarbij onderliggende mechanismes van meerdere chronische ziekten worden bestudeerd, specifiek atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Hierbij wordt tevens gekeken naar de invloed van (de combinatie van) deze ziekten op de mentale gezondheid. **Dit onderzoek is niet primair gebaseerd op de meest directe translatie naar de patiënt, maar vooral gericht op de opzet van het multimodale diermodel, ter ontrafeling van de onderliggende moleculaire en biologische mechanismen hoe deze ziektebeelden elkaar beïnvloeden.**

De keuze voor WAG/Rij ratten heeft te maken met het type kanker. De implantatie van rhabdomyosarcoma cellen is vrijwel alleen succesvol in deze rattenlijn omdat de cellen syngene zijn, m.a.w. deze kankercellen zijn ontstaan in de WAG/Rij rat. De keuze voor SD-ApoE ratten heeft te maken met de inductie van atherosclerose en vaatverkalking waar deze rattenlijn gevoelig voor is.

Achtergrondbeschrijving

Vraag 1: Waarom weegt voor u het belang van het voorgestelde project zwaarder dan het matig ongerief, de schending van integriteit en de beëindiging van het leven dat de proefdieren wordt aangedaan?

De wereldpopulatie is sinds 1800 gegroeid van 1 miljard naar 7 miljard mensen door: (i) verbeterde medische, technische, en openbare gezondheidsdiensten wat resulteerde in de controle en behandeling van ziektes, (ii) de controle van pandemieën, (iii) het einde van grote oorlogen, en (iv) verbeterde leefomstandigheden. Daardoor is de levensverwachting van 1950 tot 2014 verhoogd van 65 tot 78 jaar in de hoge inkomensklasse en van 42 tot 68 jaar in de lage- tot midden inkomensklasse. Deze cijfers laten het belang zien van de ontwikkeling van multimorbiditeit, daar de kans op multimorbiditeit verhoogt met leeftijd, waarbij multimorbiditeit niet alleen een belangrijke rol speelt in hoge inkomenslanden, maar ook in lage- en middeninkomenslanden (1).

Chronische ziekten zorgen voor 71% van de overlijdens wereldwijd (2). Steeds meer patiënten laten een ziektebeeld zien waarbij meerdere ziekten samengaan, ook wel multimorbiditeit genoemd. Multimorbiditeit heeft negatieve effecten op sterftecijfers, ziekteprogressie, ziektestadium op het punt van diagnose, behandeling en/of uitkomst door onderliggende ziektes. Hart- en vaatziekten en kanker zijn de twee meest voorkomende chronische ziekten, waarbij hart- en vaatziekten de nummer 1 doodsoorzaak wereldwijd is met 17.9 miljoen doden in 2019 (3). Onder hart- en vaatziekten representeren atherosclerose en vaatverkalking de meerderheid van de cardiovasculaire mortaliteit. Door verbeterde detectie en behandelingen van kanker zijn de sterftecijfers gedaald over de jaren, desalniettemin wordt het aantal patiënten dat overlijdt aan kanker geschat op 10 miljoen doden in 2020 (WHO). Daarbij komt kijken dat veel patiënten vastzitten aan chronische zorg, voor zowel hart- en vaatziekten als kankerbehandelingen. Hierdoor verlengen we mensenlevens, maar verhogen we de kans op meerdere ziektes tegelijkertijd, oftewel multimorbiditeit.

Op basis hiervan weegt naar onze mening het belang van het beschreven onderzoeksvoorstel zwaarder dan het ongerief waar de proefdieren aan worden blootgesteld.

Vraag 2: De inleiding is een heldere beschrijving van de fenomenologie, alleen wordt de (een) onderzoeksvraag niet helder. Wat is nu het 'gat in onze kennis' dat hier gedicht moet gaan worden? En hoe staat uw werk in relatie tot dat van andere onderzoekers op de wereld die waarschijnlijk datzelfde gat proberen te dichten? Zonder deze informatie is het belang van dit werk moeilijk te wegen.

Atherosclerose, aderverkalking en kanker zijn chronische ziekten die gezamenlijke factoren hebben, bijvoorbeeld ouderdom, roken, obesitas en genetica (4, 5). Roken veroorzaakt constrictie van de bloedvaten, veranderingen in de bloeddruk en verstoort het vetmetabolisme (6). Deze systemen zijn allemaal gelinkt aan atherosclerose/aderverkalking en kanker. De vraag die blijft open staan is hoe deze systemen deze chronische ziekten beïnvloeden. Vanuit klinische data is bekend dat overlevenden na kanker een verhoogde kans op hart- en vaatziekten en een 2-6 keer verhoogde kans op vroegtijdig overlijden hebben. Deze verhoogde kans heeft een duidelijke samenhang met de behandeling (bv. chemotherapie, bestraling, endocriene therapie, enzovoort) die wordt gegeven. Voorbeelden zijn: 1) borstkanker positief voor de estrogeen receptor kan behandeld worden met endocriene therapie; dit verhoogt echter de kans op een infarct, embolie of veneuze trombose (7), 2) doxorubicine, chemotherapie, heeft positieve effecten voor de behandeling van verschillende soorten kanker, maar laat schade zien aan het hart in de vorm van fibrose en inflammatie (8), 3) trastuzumab, een antilichaam behandeling gebruikt voor o.a. borst- en maagkanker, bindt aan de HER2 receptor op kankercellen en remt de groei, maar beschadigd ook de spiercellen van het hart doordat deze ook de HER2 receptor bevatten (7, 9). Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd doodsoorzaak nummer 1. Atherosclerose valt onder deze categorie en komt per jaar in 1.9 biljoen patiënten voor. De incidentie van kanker in deze patiëntengroep is 3.1%, dit zijn omgerekend 58 miljoen patiënten wereldwijd (10). De mechanismes en factoren waardoor dit vrij frequent voorkomt in deze patiënten is echter onbekend.

Onze huidige kennis is vooral bekend vanuit patiëntdata en gerelateerde associaties tussen verschillende ziektes. Hoewel we weten dat er een interactie bestaat tussen deze twee ziekten, worden interacties tussen morbiditeit en de consequenties van deze interacties van de behandeling op dit moment nog niet onderzocht in fundamenteel onderzoek. Daarom is het bestuderen van multimorbiditeit belangrijk om gezamenlijke fundamentele pathways aan het licht te brengen, die later eventueel nieuwe therapeutische invalshoeken voor de kliniek kunnen geven. Verschillende diermodellen zijn in de laatste jaren opgezet in relatie tot multimorbiditeit, onder andere: hart- en vaatziekten gecombineerd met nierfalen, hart- en vaatziekten gecombineerd met COPD, hypertensie gecombineerd met hartinfarct en hart- en vaatziekten/COPD gecombineerd met roken. De relevantie van dit projectvoorstel is echter de combinatie van een multimodaal model waarbij onderliggende mechanismes van meerdere chronische ziekten worden bestudeerd, specifiek atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Tevens wordt de invloed van (de combinatie van) deze ziekten op de mentale gezondheid bestudeerd.

Vraag 3: Het wordt nergens expliciet gezegd, maar is de onderzoeksvraag misschien te onderzoeken of er een gezamenlijke grond is (er gelijksoortige werkingsmechanismen zijn) voor de 3 ziektepatronen die verklaren dat ze elkaars voorkomen en verschijnselen versterken? Als dat werkelijk de overkoepelende vraag is waarom wordt die zo niet benoemd?

In de inleiding van ons proposal wordt het doel van dit onderzoek genoemd:

“Overall purpose of this research

In summary, the novelty of our approach is the establishment of a multi-modal disease model whereby the underlying mechanisms of multiple chronic disease, in particular atherosclerosis, vascular calcification, and cancer, as well as their consequences on mental health, can be studied.”

Dit voorstel beoogt een multimodaal diermodel te ontwikkelen. De onderzoeksvraag of er een gezamenlijke grond is voor atherosclerose, aderverkalking en kanker die verklaren dat ze elkaars voorkomen en verschijnselen versterken, wordt in aim 3 behandeld in ons proposal. Alhoewel dit uiteindelijk ons doel is, staat dit nog niet centraal hier.

Vraag 4: In de inleiding worden met name atherosclerose en aderverkalking belicht, de comorbiditeit van deze aandoeningen met mentale gezondheid en kanker wordt onderbouwd, maar er is vrijwel geen aandacht voor de laatste twee ziektebeelden die toch erg belangrijk zijn voor de aanvraag.

In de inleiding worden atherosclerose, vaatverkalking en kanker beter belicht dan mentale gezondheid. Dit onderzoeksvoorstel bestudeert primair de interactie tussen (1) atherosclerose, vaatverkalking en (2) kanker. En dus geen driehoeksverhouding in relatie tot (3) mentale gezondheid. Dat gezegd zijnde, daar bekend is dat ziektebeelden zoals atherosclerose, vaatverkalking en kanker een effect hebben op mentale gezondheid, willen we tevens weten in hoeverre de interactie tussen deze somatische ziektes de mentale gezondheid beïnvloedt. Het gezamenlijke effect van deze somatische ziektes op mentale gezondheid beïnvloedt mogelijkerwijs ook weer het beloop van deze verschillende somatische ziektes, net zozeer als deze elkaar onderling beïnvloeden. Waar het huidige PV een eerste aanzet is om de rol van mentale gezondheid in deze context te bestuderen, ligt de nadruk op het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker.

Vraag 5: Het argument waarom niet (een deel van de) studies bij de mens kan worden gedaan is niet overtuigend. Zeker de correlatieve effecten op mentaal welbevinden zouden waarschijnlijk best deels bij de mens bestudeerd kunnen worden. De toevoeging van de trefwoorden co-morbidity en mental health leveren in PubMed al ruim 20.000 citaties op. Graag uw opinie of (deel)onderzoek bij de mens een optie is tot reductie van proefdieren?

Voor dit onderzoek wordt een literatuurstudie uitgevoerd, in de vorm van een review, waar ook zeker patiëntenstudies in zullen worden verwerkt. Hoewel deze studies ons waardevolle informatie zullen geven, zal dit weinig moleculaire en biologische informatie geven.

De invloed van atherosclerose, vaatverkalking en kanker op mentale gezondheid is niet een losstaand onderdeel van ons onderzoek. Het hoofddoel is het opzetten van een multimodaal diermodel, zijnde de combinatie van atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Omdat dit een nieuw model is, waarbij uiteindelijk WAG/Rij en/of SD-ApoE ratten worden gebruikt, zijn de effecten op mentale gezondheid, ofwel het welzijn van de dieren niet bekend. De keuze voor WAG/Rij ratten heeft te maken met het type kanker. De implantatie van rhabdomyosarcoma cellen is vrijwel alleen succesvol in deze rattenlijn omdat de cellen syngene zijn, m.a.w. deze kankercellen zijn ontstaan in de WAG/Rij rat. De keuze voor SD-ApoE ratten heeft te maken met de inductie van atherosclerose en vaatverkalking waar deze rattenlijn gevoelig voor is. Dit onderzoek is niet zozeer gebaseerd op de translatie naar de patiënt, maar vooral gericht op de opzet van het multimodale model. Zou je dit deel weglaten, mis je een essentieel deel van dit onderzoek wat het welzijn van de dieren in acht neemt. Daarnaast geeft de zoekterm co-morbiditeit en mentale gezondheid een verkeerd beeld. Hierbij worden hoofdzakelijk de artikelen weergegeven die een associatie laten zien tussen ziekte X en mentale gezondheid. In dit onderzoek willen we de invloed van atherosclerose, vaatverkalking en kanker op mentale gezondheid onderzoeken (en op de lange termijn ook of het gezamenlijke effect van deze somatische ziektes op mentale gezondheid mogelijkerwijs ook indirect weer het beloop van deze verschillende somatische ziektes beïnvloedt), niet de associatie van de ziekten an sich op mentale gezondheid. Dit is een nieuw concept.

Vraag 6: In de inleiding geeft u aan dat het risico op multimorbiditeit toeneemt met de leeftijd. U kiest er echter voor om met jonge ratten te gaan werken. Het is bekend dat ouderen anders reageren op bv. medicatie dan jongeren. Kunt u uitleggen wat de reden is dat u jonge dieren gebruikt en geen oudere dieren?

Multimorbiditeit is een ziekte die voorkomt in alle leeftijdsgroepen, maar komt veelal tot uiting bij oudere mensen (m.b.v. diagnoses). In deze studie worden jongvolwassen dieren gebruikt doordat onze groep daar ervaring mee heeft. Een andere reden om jongvolwassen dieren in deze studie te gebruiken is door het gebruik hoog vet dieet van 10-12 weken, bij oudere dieren zal de beeldvorming aan het einde van het traject lastiger worden. Daarnaast verkleinen we de kans op epilepsie (WAG/Rij ratten) of dementie (ApoE ratten) door jongvolwassen dieren te gebruiken.

Vraag 7: U spreekt in heel brede zin over ‘mental disorders’, terwijl u voor CVD en kanker veel specifiek bent. Kunt u betreffende ‘mental disorders’ en ‘mental health’ meer informatie verstrekken en laatstgenoemde definiëren?

Zoals gesteld, vormt dit projectvoorstel een eerste aanzet om de effecten van de interactie tussen hart- en vaatziekten en kanker op (en de mogelijke rol van) mentale gezondheid mee te nemen. De reden dat we mentale ziektes (dat zijn er overigens behoorlijk veel) niet specificeren, is omdat er vrijwel niets bekend is hoe de combinatie van hart- en vaatziekten en kanker de geestelijke gezondheid i.r.t. specifieke ziektebeelden beïnvloedt (en andersom). Dit sluit weer aan bij de insteek om (de interactie tussen) 1) hart- en vaatziekten en 2) kanker centraal te stellen.

Vraag 8: Uw benadering van mentale gezondheid is ook erg open. Kunt u nader aangeven wat u verwacht te vinden? Wat zijn mogelijke pathways? Wat zijn uw hypothesen?

Zoals hierboven benoemd bij vraag 4 en vraag 7, staat de benadering van mentale gezondheid open in ons projectvoorstel omdat er vrijwel niets bekend is over hoe de combinatie van hart- en vaatziekten en kanker de geestelijke gezondheid beïnvloedt (en andersom). Daarbij hebben we als hypothese dat een verminderde cognitieve en affectieve functie een negatief effect hebben op het beloop van zowel hart- en vaatziekten en kanker. Zowel afzonderlijk als in combinatie. Deze twee hypothesen zullen meer centraal staan in mogelijk vervolgonderzoek, waarbij het huidige PV een eerste aanzet betreft.

Vraag 9: De terminologie die gebezigd wordt in uw projectaanvraag komt wat verwarrend over. Het is natuurlijk duidelijk dat cardiovasculaire aandoeningen een belangrijke doodsoorzaak zijn bij mensen. De diermodellen die u wilt creëren lijken gekarakteriseerd te worden door atherosclerosis sec en vaatverkalking. Het lijkt daarom zuiverder te spreken van vaataandoeningen en uw definitie van CVD ‘as the combination of atherosclerosis and vascular calcification’ lijkt verwarrend daar u in vivo ook geen metingen verricht aangaande hartfunctie. Graag daarop uw reactie.

*We zijn het eens met de opmerking van de **5.1 lid2h** en hebben de terminologie aangepast in het projectvoorstel.*

Vraag 10: Een diepgaandere beschrijving van nieuwvormingen zou in uw projectaanvraag niet misstaan, want het enkel bezigen van de term kanker verhult mogelijk het potentieel aan eminente kennis aangaande de biologie van nieuwvormingen binnen uw onderzoeksgroepen. In dit kader verdient het ook een bespiegeling waarom een zeldzame vorm van nieuwvorming als die van dwarsgestreept spierweefsel is verkozen alsmede een wat minder zeldzame vorm van een niertumor mede met het oog op hun translationale waarde?

De modellen zijn gekozen op basis van:

- 1) *De expertise*
- 2) *Syngene model rhabdo/WAG-Rij ratten en ApoE ratten*
- 3) *Grotere tumoren met patiënt relevante tumor micro-environment*

Hierbij staat het model centraal. Het translationele gedeelte ligt in het feit van de comorbiditeit.

Vraag 11: De incidentie van kanker is 3,1% bij patiënten met atherosclerose geeft u aan. Rechtvaardigt dit uws inziens het creëren van diermodellen op basis van atherosclerose en ligt een andere pathologie die meer prevalent is niet meer voor de hand?

Ja, hart- en vaatziekten zijn doodsoorzaak nummer 1 wereldwijd. Atherosclerose valt onder deze categorie en komt per jaar in 1.9 biljoen patiënten voor. De incidentie van kanker in deze patiëntengroep is 3.1%, dit zijn omgerekend 58 miljoen patiënten wereldwijd (10). In ons opzicht toch aan aanzienlijk grote groep mensen waarbij meer inzicht in de ziektebeelden uiteindelijk kan leiden tot betere zorg en betere kwaliteit van leven. Vandaar dit voorstadium waarbij we een multimodaal model willen creëren om meer inzicht te krijgen in het onderliggende mechanisme tussen kanker en atherosclerose.

Vraag 12: Het is onduidelijk waarom en hoe “underlying mechanisms bestudeerd worden, of dit zinvol is en waarom dit niet kan in materiaal verzameld onder doel 2.

In doel 2 worden atherosclerose en vaatverkalking samen bestudeerd met kanker, alsmede de effecten van hun interactie op mentale gezondheid. Wat we willen bereiken in doel 3 is het onderliggende mechanisme verder onderzoeken, waarbij we specifiek kijken of ze afkomstig zijn vanuit het atherosclerose perspectief of vanuit vaatverkalking, wat niet mogelijk is in doelstelling 2. De opzet van doel 3 is daarom zo opgesteld dat er een model wordt gemaakt met een combinatie van atherosclerose, kanker en het effect op mentale gezondheid en een combinatie van vaatverkalking, kanker en het effect op mentale gezondheid. Doel 3 wordt ook enkel uitgevoerd als er een interactie werd aangetoond in doel 2.

Vraag 13: De literatuur leert dat in WAG/Rij ratten mogelijk epilepsie en depressie comorbiteiten betreffen (10.1016/j.pnpbp.2010.11.010). Bij het gebruik van een dergelijke lijn is het dus de vraag waar de ratten model voor staan m.b.t. mental disorders. Bovendien vermenigvuldigt het aantal comorbiteiten (u had al atherosclerose, aderverkalking en kanker), wat vragen oproept met betrekking tot validiteit en haalbaarheid van het onderzoek. Kunt u hier een toelichting op geven?

Voor de insteek wat betreft de rol van mentale gezondheid in dit PV, zie de eerdere vragen (o.a. vraag 4 en vraag 7). Verder is het noemenswaardig dat het feit dat deze dieren bijvoorbeeld meer depressie-gerelateerd gedrag vertonen de relevantie van ons onderzoek juist ondersteunt, zowel in relatie tot de interacties tussen ziektebeelden an sich, alsmede in relatie tot mogelijke onderliggende mechanismen. Overigens kan hierbij niet worden gesteld dat WAG/Rij ratten lijden aan een depressie (hetgeen überhaupt niet van knaagdieren kan worden gesteld). We zien alleen een toename in gerelateerde gedragingen t.o.v. wildtype dieren. In ons voorstel zijn voldoende controlegroepen aanwezig om te concluderen waardoor eventuele veranderingen op het cognitieve en affectieve vlak veroorzaakt worden.

Vraag 14: Depressief gedrag als co-morbiditeit t.g.v de spontane epilepsie interacteert bovendien met de main read-out mental health. Dit lijkt een opmerkelijke keuze. Graag daarop uw reactie.

Zie ons antwoord op vraag 13. De grotere gevoeligheid voor het vertonen van depressie-gerelateerd gedrag is geen argument tegen het gebruik van dit diermodel. Het is eerder een plus. En we nemen dit gedrag mee. Onze hypothese is dat de combinatie van dit model met kanker tot een toename in depressie-gerelateerd gedrag leidt, waar nodig.

Vraag 15: U geeft aan dat: “The rat has been chosen as species based on our extensive experience within cancer therapy, imaging, and experiments addressing mental health (37-39).” Kunt u ook onderbouwen waarom de rat het beste model is voor het beantwoorden van de vragen die u wilt gaan stellen? De keuze voor de rattenstammen is opmerkelijk (gezien de gevoeligheid voor epileptie). Kunt u meer informatie geven met betrekking tot de keuze voor ApoEtm1sage en WAG/Rij rattenlijnen? Ook wordt niet onderbouwd waarom er twee stammen gebruikt worden (duplicatie aantallen)?

De keuze voor ApoE- en WAG/Rij ratten is op basis van de ziektebeelden gekozen. De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van artherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model). Omdat dit de opzet is van een nieuw model, weten we niet op voorhand welk model succesvol gaat zijn in het ontwikkelen van co-morbiditeit, of dat ze beide succesvol zijn, daarom nemen we beide invalshoeken mee. We hebben daarenboven ook een strikte go/no-go beslisstrategie meegenomen om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren.

Vraag 16: WAG/Rij ratten hebben spontane epileptische aanvallen (met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit) APOE ko ratten zijn al een model voor atherosclerose (AT), alhoewel ook daar blijkbaar discussie over is (Sci Rep . 2018 Apr 3;8(1):5416. doi: 10.1038/s41598-018-23835- z.) en er is een link met Alzheimer. Beide stammen lijken niet per sé bekend te staan om hun tumorgevoeligheid. Wat is dan wel de motivatie voor deze keuze? Kunt u de tumorgevoeligheid van deze stammen onderbouwen met literatuur?

Zie voorgaande vragen. Het feit dat deze dieren meer hersen-gerelateerde problematiek vertonen, toont net de relevante van het bestuderen van het mentale functioneren aan. Dat dit meerdere verschillende problemen betreft heeft grotendeels te maken met een gedeelde etiologie van deze ziektes. De motivatie voor deze ratlijnen is bij vraag 15 uitgelegd, waarbij we de vanuit beide invalshoeken een rattenstam hebben geselecteerd. Een rattenstam die gevoelig is voor atherosclerose/ vaatverkalking (ApoE) en een die gevoelig is voor de ontwikkeling van kanker (WAG/Rij). Op PubMed zijn 230 publicaties te vinden over de WAG/Rij ratlijn en de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model).

Vraag 17: Hoe gaat u uw diermodel precies valideren? Hoe beoordeelt u of het een waardevol model is voor het bestuderen van onderliggende mechanismen bij multi-morbide ziekte bij mensen oftewel waarom leidt de combinatie van keuzes tot translationeel valide modellen?

In ons projectvoorstel hebben we beschreven dat we het diermodel valideren met bloedafnames (cholesterolmeting), beeldvorming (PET/SPECT/CT scans en 2-photon intravitaal microscopie) en immunohistochemistry. Voorlopig is dit model onderzoek gericht, waarbij we vooral letten op de ontwikkeling van plaques met verkalking en de vorming van kanker. De translatie naar de mens, zeker met multimodale diermodellen waarbij meerdere ziektes betrokken zijn, moet goed doordacht gebeuren, waarbij we weten waar we over praten. Gezien dit een eerste opzet is, waarbij we nog niet weten hoe het zich zal ontwikkelen, is de eerst stap een goed onderzoeksmodel te creëren waarbij we inzicht krijgen in het onderliggende mechanisme van de betrokken ziekten, waarop in toekomstig onderzoek kan ingewerkt worden, bv op het vlak van behandelingen.

Vraag 18: U schrijft dat anxiety klachten het vaakst bij longtumoren optreden. Is bekend hoe vaak psychische klachten optreden bij de door u gekozen te implanteren tumoren? Heeft u ook gegevens uit de literatuur in hoeverre ontsteking in het ontstaan van psychische klachten een rol speelt?

Nee, dit is niet bekend. Met dit model willen we meer inzicht krijgen in de interactie tussen de betrokken somatische ziekten en onder andere angst en andere gerelateerde psychische endofenotypes. De cruciale rol van ontstekingsprocessen op psychisch functioneren omslaat een compleet (en behoorlijk breed) vakgebied, dat van de psychoneuroimmunologie. Denk hierbij aan bijvoorbeeld, doch zeker niet uitsluitend, aan de cytokine hypothese van depressie (en gerelateerde aandoeningen).

Vraag 19: Het lijkt het erop dat u de WAG-Rij ratten gebruikt vanwege de vatbaarheid voor epilepsie (en mogelijk depressie). De combinatie met PCSK9 en implantatie van kankerweefsel maakt dat u mogelijk een diermodel krijgt met comorbiditeiten voor atherosclerose, aderkalking, kanker en epilepsie. Maar hoe adresseert u de mentale component in het model met ApoEtm1sage ratten?

Dit is niet correct, WAG/Rij ratten worden, zoals hierboven ook al benadrukt, gebruikt omwille van syngene rabdo model. Deze cellen groeien in geen ander model (tenzij een naakte rat). Dus de WAG/Rij ratlijn is het meest gunstig voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen. Voor de link met de mentale component, zie de voorgaande vragen (onder andere 13, 14, 16 en 18).

Vraag 20: Het is niet duidelijk waarom atherosclerose en “vascular calcification” uit elkaar gehaald worden. Heeft dit te maken met het beschreven verschil in positie van de verkalking in de vaten (intima/medial)?

Vaatverkalking hoeft niet per se gelinkt te zijn aan atherosclerose, dit heeft inderdaad te maken met de plaats van verkalking. Mediale verkalking gebeurt voornamelijk in gladde spiercellen, terwijl atherosclerose plaatsvindt in de intima. Intimale verkalking is verkalking in atherosclerose.

Vraag 21: In de achtergrond worden intimale en mediale calcificering voorgesteld. Komen deze aspecten in het project nog terug?

Ja, met behulp van beeldvorming en immunohistochemistry wordt in dit project de verkalking bepaald en daarbij ook waar de verkalking heeft plaatsgevonden.

Doelen

Vraag 22: Zou het primaire doel ook eenvoudig weg kunnen zijn 'provide information in the interaction between the diseases atherosclerosis, vascular calcification and cancer'? Dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan lijkt nogal een open deur en aan de andere kant is meten van mentale gezondheid in ratten, als een voorspelling voor menselijke gevoelens, nogal een hachelijke onderneming (hoe hard is dit deel van de wetenschap?).

Het feit dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan is inderdaad een open deur. Hoe dit alles mogelijkwijs van invloed is op het beloop van ziekte (en combinaties van ziektes) is dat niet. Zie ook onze antwoorden op onder andere de vragen 4, 5, 7 en 8. Het bestuderen van mentale gezondheid in knaagdieren is inderdaad geen eenvoudige exercitie, doch zeker van bewezen meerwaarde. Angst en cognitie zijn bijvoorbeeld heel goed te meten in knaagdieren.

Vraag 23: De **5.1 lid2h** verzoekt u het verschil tussen de doelen 2 en 3 duidelijker uit te leggen.

Zie hiervoor ook de uitleg op vraag 12. Met doel 2 willen we graag het multimodale model creëren, waarbij we in doel 3 focuseren op het onderliggende mechanisme. Om te achterhalen welke effecten afkomstig zijn van atherosclerose, creëren we een ratmodel met atherosclerose en kanker en kijken we naar de effecten op mentale gezondheid. Om te achterhalen welke effecten afkomstig zijn van vaatverkalking, creëren we een ratmodel met vaatverkalking en kanker en kijken we naar de effecten op mentale gezondheid. Dit is niet mogelijk is doelstelling 2 omdat atherosclerose en vaatverkalking samen worden geïnduceerd in een model. Strikte go/no-go beslismomenten bepalen of doel 3 wel of niet uitgevoerd zal worden.

Vraag 24: Doel 1.2: wat is de primaire uitkomst die voor de selectie van de rat-stam doorslaggevend is?

In ons voorstel en bijlage hebben we beschreven dat we het diermodel willen valideren met bloedafnamen (cholesterolmeting), imaging (PET/SPECT/CT imaging en 2-photon intravital microscopy) en immunohistochemistry.

Onderzoeksopzet

Vraag 25: Wat is de reden met WAG/Rij ratten aan de slag te gaan, terwijl nota bene SD Apoetm1sage ratten als model voor atherosclerose gewoon te koop zijn?

Zie hiervoor ook het antwoord op vraag 15 en 16. De keuze voor ApoE- en WAG/Rij ratten is gekozen op basis van de ziektebeelden. De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen. Omdat dit de opzet is van een nieuw model, weten we niet op voorhand welk model succesvol gaat zijn, of dat ze beide succesvol zijn, daarom nemen we beide invalshoeken mee.

Vraag 26: Lijkt het niet ook voor de hand te liggen eerst te kijken of Apoetm1sage ratten kunnen leiden tot het beoogde diermodel?

Zoals hierboven benoemd (vraag 15, 16 en 25), zijn beide ratlijnen specifiek gekozen vanuit onderzoekdoeleinden. De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen. Omdat dit de opzet is van een nieuw model, weten we niet op voorhand welk model succesvol gaat zijn, of dat ze beide succesvol zijn, daarom nemen we beide invalshoeken mee. Hiervoor hebben we ook gerichte go/no-go momenten ingebouwd in ons projectvoorstel, zodat we gebaseerd daarop wel overwogen keuzes kunnen maken met welke ratlijn of beide ratlijnen (mochten ze beide succesvol zijn) door te kunnen gaan. Mochten we eerst starten met een ratlijn en daarna pas met de ander verliezen we maanden tijd.

Vraag 27: Zou succesvolle creatie van het beoogde diermodel op basis van Apoetm1sage ratten maar zonder effecten op 'mentale gezondheid' niet kunnen dienen als go/no go moment voor de creatie van het beoogde diermodel op basis van WAG/Rij ratten?

We willen graag een multimodaal diermodel creëren in ApoE- of WAG/Rij ratten met atherosclerose, vaatverkalking, kanker kijkend naar de invloed op mentale gezondheid. De ene ratlijn dient niet als controle voor de andere ratlijn, beide ratlijnen zijn gekozen op basis van de ziektebeelden zoals hierboven uitgelegd (vraag 15, 16, 25 en 26).

Vraag 28: Bij muizen is het ontstaan van atherosclerose sterk afhankelijk van de genetische achtergrond. Zelfs bij deletie van het apolipoproteïne E gen ontwikkelen CH3 en Balb/c muizen vrijwel geen atherosclerose. Sinds de SD achtergrond blijkbaar compatibel is met atherosclerose in de rat, rijst de vraag of de AAV-PCSK9 niet ook in deze achtergrond kunnen worden uitgevoerd.

Zoals hierboven uitgelegd in vraag 15, 16, 25 en 26, beide ratlijnen zijn specifiek geselecteerd vanuit onderzoeksdoeleinden. *De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen.*

De AAV-PCSK9 invalshoek is gekozen omdat WAG/Rij ratten niet vanuit zichzelf gevoelig zijn voor alleen een hoog vet dieet. Daarentegen hebben deze ratten als voordeel dat het vrijwel de enige ratlijn is waarbij implementatie mogelijk is van rhabdomyosarcoma cellen (uitgezonderd naakte ratten). Om toch atherosclerose en vaatverkalking te implementeren hebben we gekozen voor AAV-PCSK9.

Vraag 29: Het apolipoproteïne E gen is een bekend locus voor genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer (doi: 10.1001/jama.1997.03550160069041). Hoewel deletie van ApoE in muizen primair tot hyperlipidemie leidt, is er ook een cognitieve afwijking in ApoE-/- muizen (zie: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.604150>). Het is aannemelijk dat dit in ratten ook het geval is, en dit heeft mogelijk ook gevolgen voor de keuze van SD-ApoE-/- ratten voor gedragsstudies. Verder hebben studies laten zien dat deletie van het ApoE gen tot ontstekingen in de choroid-plexus in het brein van de muis leidt (doi: 10.1038/s41591-018-0336-8) en ontstekingen in dit gebied kunnen ook tot depressies en suïcidaal gedrag bij mensen leiden (DOI: 10.3389/fpsy.2015.00138). De 5.1 lid2h verneemt graag uw visie op de bovengenoemde studies en de mogelijke gevolgen voor uw proefopzet.

Zoals eerder toegelicht in ons antwoorden, bijvoorbeeld op vraag 4, bestudeert dit onderzoeksvoorstel primair de interactie tussen (1) atherosclerose, vaatverkalking en (2) kanker. En dus geen driehoeksverhouding in relatie tot (3) mentale gezondheid. Dat gezegd zijnde, daar bekend is dat ziektebeelden zoals atherosclerose, vaatverkalking en kanker een effect hebben op mentale gezondheid, willen we tevens weten in hoeverre de interactie tussen deze somatische ziektes de mentale gezondheid beïnvloedt. Het gezamenlijke effect van deze somatische ziektes op mentale gezondheid beïnvloedt mogelijk ook weer het beloop van deze verschillende somatische ziektes, net zozeer als deze elkaar onderling beïnvloeden. Waar het huidige PV een eerste aanzet is om de rol van mentale gezondheid in deze context te bestuderen, ligt de nadruk op het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Dat gezegd zijnde, is co-morbiditeit met andere hersen-gerelateerde problematiek binnen onze modellen iets dat je ook mag verwachten op basis van deels overlappende etiologische mechanismen. Zie onder meer vragen 13, 14 en 16.

Vraag 30: Bij ApoE^{-/-} muizen op een B6 achtergrond vindt er ook atherosclerose ontwikkeling plaats bij een normaal dieet (wel minder snel als bij een western dieet). Is dit ook het geval bij de SD- ApoE^{-/-} ratten?

Dit is niet direct relevant voor de aanvraag, ons projectvoorstel wordt beëindigd na 3 maanden dieet (WTD of chow dieet).

Vraag 31: De 5.1 lid2h vraagt u toe te lichten in hoeverre de imaging methoden superieur zijn aan de "klassieke" histologische methoden van het karakteriseren van plaques en calcificatie.

Het gebruik van gevalideerde imaging markers geeft ons het voordeel de dieren longitudinaal op te volgen in de tijd. Dit kan leiden tot toekomstige interventie studies, waarbij het aantal dieren per studie sterk beperkt wordt. De plaque wordt achteraf bevestigd met histologie omdat deze niet altijd zichtbaar is met imaging, vandaar de twee methodes.

Vraag 32: Onder aim3 wilt u mechanismen gaan bestuderen. De beschrijving van de studie is identiek aan aims 1 en 2, dus die informatie hebt u al? Het wordt niet duidelijk wat de relevante mechanismen zijn die bestudeerd zouden kunnen worden en of er translationele waarde is.

Zie ook het antwoord op vraag 12 en 23. In doelstelling 1 en 2 creëren we een multimorbiditeit model waarbij we in doelstelling 3 meer gedetailleerd naar het onderliggende mechanisme gaan kijken. Om te achterhalen welke effecten afkomstig zijn van atherosclerose, creëren we een ratmodel met atherosclerose en kanker en kijken we naar de effecten op mentale gezondheid. Om te achterhalen welke effecten afkomstig zijn van vaatverkalking, creëren we een ratmodel met vaatverkalking en kanker en kijken we naar de effecten op mentale gezondheid. Deze twee combinaties gebruiken we niet in doelstelling 1 en 2, waardoor doelstelling 3 compleet nieuw is en daardoor relevant. Strikte go/no-go beslismomenten zullen gehanteerd worden tussen doelstelling 2 en 3.

Vraag 33: Als het doel is een multi-modaal ziektemodel te maken (aim2) en AT+ “vascular calcification samen als CVD gezien worden (introdactie) waarom worden die twee onder aim3 dan toch weer separaat bestudeerd oftewel waarom atherosclerose en “andere” aderverkalking apart van elkaar bestudeerd moeten worden? Waarom dan überhaupt een multi-modaal model maken?

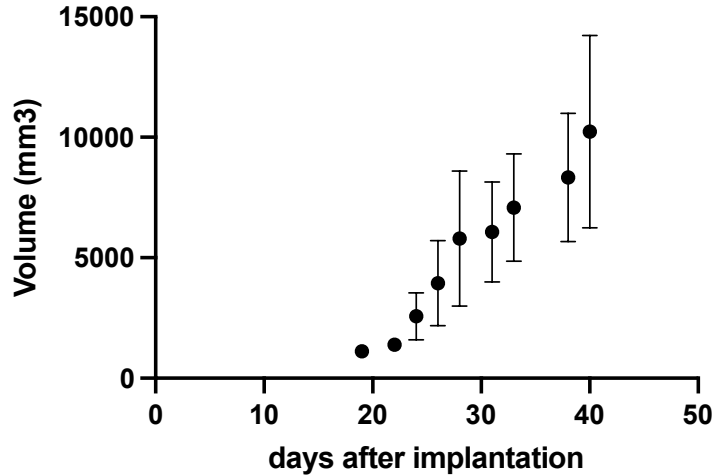
Zie ook het antwoord op vraag 12, 23 en 32. Doelstelling 3 is aanvulling op het project om de onderliggende mechanismes beter te kunnen bestuderen. Het overkoepelende doel blijft om een multi-modaal ziektemodel op te zetten waar meer informatie over de verschillende ziektebeelden uit kan worden gehaald en de overkoepelende relatie tot de ziektebeelden duidelijker wordt uitgelicht. Strikte go/no-go beslismomenten zullen gehanteerd worden tussen doelstelling 2 en 3.

Vraag 34: Deze sectie is nu herhaling van doelen, waarbij een verwijzing naar 3.4.1. Onderbouwing van keuzes op hoofdlijnen ontbreekt. Gaarne uw opinie waarom WTD en Warfarin/vit k onderdeel uitmaken van de onderzoeksopzet?

WTD en warfarine/vitamine K zijn cruciaal voor het induceren van atherosclerose en vaatverkalking, wat een groot onderdeel is van dit onderzoek.

Vraag 35: De duur waarin dieren in experiment zijn is niet duidelijk. U geeft aan dat overall, the longest period an animal is in experiment is estimated to be 3 months, maar de duur waarin een gemodificeerd diet wordt verstrekt al dan niet met warfarin/vitamine K1 behelst al ongeveer 12 weken, hetgeen als onderdeel van de experimentele periode kan worden gezien. Vervolgens wordt nog een kwaadaardige nieuwvorming gecreëerd, waarvan u aangeeft dat het 3-5 weken duurt alvorens deze wordt opgepikt middels beeldvorming. Het zal dan nog wel een aantal weken duren voordat deze een volume heeft bereikt van 15 cm³. Graag deze duur verduidelijken.

Het experiment wordt gestart wanneer de dieren ± 11 weken zijn. Daarna wordt wel of niet een virus injectie uitgevoerd en zullen de dieren gestart worden op een volgend dieet: 1) westers dieet, 2) controle dieet, 3) westers dieet met warfarine en vitamine K1, of 4) controle dieet met warfarine en vitamine K1 voor 12 weken. De tumor inductie zal plaatsvinden in de laatste 3-5 weken van dit dieet en dus niet voor extra tijd zorgen in het experiment. Na de 12 weken zullen de dieren door middel van beeldvorming gekwantificeerd worden en zal het experiment beëindigd worden. Het beoogde tumor volume nodig voor de experimenten wordt bereikt tegen 5 weken na implantatie, zoals aangegeven in onderstaande figuur.



Vraag 36: De figuren in de bijlage zijn weinig informatief. Op basis van deze figuren is de duur waarin dieren in experiment zijn niet vast te stellen. De beeldvormende experimenten omvatten toch maximaal 12 beeldvormingen plus anaesthesie met verkoevering daar tussendoor en die lijken welhaast op dezelfde dag plaats te vinden. In figuur 3 ontstaat er nieuwvorming na toediening onderhuids van RK#E-ras cellen, maar bij de WAG/Rij ratten ontstaat de nieuwvorming kennelijk zonder onderhuidse toediening. De **5.1 lid2h** verzoekt u ook de tijden en tijdpunten in de figuren 1-5 te vermelden.

Beeldvorming wordt alleen aan het einde uitgevoerd, zoals aangegeven in de figuren, net voor opoffering. Intravitale microscopie is het eindpunt waarbij de dieren worden opgeofferd. De implementatie van de tumor wordt bij beide ratlijnen anders toegepast zoals uitgelegd is in sectie 3.4.1 van het proposal. De tumor bij de ApoE-ratlijn wordt geïnduceerd met behulp van een RK3E-ras injectie. In tegenstelling tot de WAG/Rij-ratlijn, hierbij gebruiken we implantatie van syngeneic rhabdomyosarcoma cellen. Om dit duidelijker weer te geven is in figuur 3 van de bijlage bij de WAG/Rij ratlijn ook bijgevoegd hoe de tumor geïnduceerd wordt.

Vraag 37: Verwacht u fysiologische reacties op de genoemde labels?

Nee, die verwachten we niet.

Vraag 38: Zou het ook niet aanbevelenswaardig zijn om gedragstesten te doen met de dieren aan het begin van de experimenten, zodat ze hun eigen controle zijn?

Het grote merendeel van de gedragstaken kan men slechts één keer uitvoeren, omdat men anders (hoofdzakelijk geheugen-gerelateerde) effecten overerft van de ene trial naar de volgende. Omdat alle noodzakelijke controlegroepen worden meegenomen, leidt de huidige opzet tot een betrouwbare conclusie omtrent het effect van individuele en combinaties van ziektebeelden op cognitie en affect (niet-gepaarde vergelijking).

Vraag 39: Ten aanzien van aim 1.3 lijkt het raadzaam ook cholesterol te meten in de SD-ApoE-dieren met chow en western dieet.

Zoals beschreven in sectie 3.4.1 van ons proposal zal atherosclerose en vaatverkalking worden gemeten met cholesterolmetingen en immunohistochemistry. De cholesterolmetingen zullen dus worden uitgevoerd in deze dieren.

Vraag 40: In welk bloedvat wordt de intravitaal microscopie uitgevoerd? [Bij muizen vindt spontane plaque ontwikkeling primair in de aorta(boog) plaats.]

We hebben sinds 2011 ervaring met intravitale multiphoton microscopie van de carotide en de bifurcatie. Dit zijn ook de plekken waar we plaques verwachten. Zie hiervoor de volgende publicaties (11-19).

Vraag 41: Waarom zijn deze vijf gedragstesten nu precies nodig?

Zie onze antwoorden op onder andere vragen 4-7. Dit onderzoeksvorstel betreft een eerste aanzet om de rol van mentale gezondheid in de context van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te bestuderen. Er is derhalve gekozen voor een algehele (brede screening) op het vlak van cognitie en affect, temeer omdat deze aspecten mogelijk ook weer het beloop van ziekte kan beïnvloeden.

Vraag 42: De combinatie van i.p + i.v. probe injections suggereert dat er tot 24 keer PET/Spect/imaging bij een individueel dier gedaan wordt. Informatie over hoeveel probes per dier gebruikt worden en de temporele spreiding ontbreekt (gezien het gebruik van 18F en spect isotopen ieg een dag?) Dit is wel relevant voor de ongerief inschatting. Veel meetpunten achter elkaar heeft meer impact op het dier.

De markers staan beschreven in sectie 3.4.1 van het projectvoorstel onder elke doelstelling. Een samenvatting van de markers die we beschrijven zijn: celdood (anxA5), verkalking (Na18F en fetuin-A), hypoxie (18F-HX4), ontsteking (Rantes en 18FDG). Verder staat beschreven in het proposal en de bijlage dat we op het einde van het traject meerdere tijdstippen nemen om deze markers te meten. Na deze metingen zal de opoffering plaatsvinden. Uit vorige studies is gebleken dat dit zorgt voor matig ongerief (20, 21).

Vraag 43: U gaat een deel van de dieren behandelen met een bloedverdunner en vervolgens moet u herhaaldelijk staarvene canulatie doen voor iv toedieningen van (PET) probes. Verwacht u geen problemen met bloedingen, ongerief en uitval van dieren a.g.v. deze procedure?

Gezien we een keer aan het einde van het traject beeldvorming en de PET markers toedienen en dit niet meerdere malen herhalen tijdens de tijdlijn verwachten we geen problemen. Zelf bij meerdere canulaties, nodig voor meerdere beeldvormingssessies zijn in het verleden nooit verhoogd ongerief of bloedingen waargenomen (20, 21).

Ongerief

Vraag 44: De duur waarin een gemodificeerd diet wordt verstrekt (al dan niet met warfarin/vitamine K1) behelst al ongeveer 12 weken, hetgeen als onderdeel van de experimentele periode kan worden gezien. Vervolgens wordt nog een kwaadaardige nieuwvorming gecreëerd, waarvan u aangeeft dat het 3-5 weken duurt alvorens deze wordt opgepikt middels beeldvorming. Het zal dan nog wel een aantal weken duren voordat deze een volume heeft bereikt van 15 cm³. Bij dergelijke dieren duurt dan ook de hypercholesterolaemie met daarnaast vaatverkalking tenminste ruim 5 weken voort afhankelijk van de groeisnelheid van de nieuwvorming nog los van de groei van de nieuwvorming zelf. Is het niet denkbeeldig dat met name bij deze dieren het ongerief matig overschrijdt?

Zie voor het antwoord op deze vraag ook het antwoord op vraag 35. Het experiment wordt gestart wanneer de dieren ± 11 weken zijn. Daarna wordt wel of niet een virus injectie uitgevoerd en zullen de dieren gestart worden op een volgend dieet: 1) westers dieet, 2) controle dieet, 3) westers dieet met warfarine en vitamine K1, of 4) controle dieet met warfarine en vitamine K1 voor 12 weken. De tumor inductie zal plaatsvinden in de laatste 3-5 weken van dit dieet en dus niet voor extra tijd zorgen in het experiment. Tumoren zijn voelbaar vanaf 2 weken na implantatie en hebben het vereiste volume voor beeldvorming tegen 5 weken na implantatie. De tumor zal het volume 15 cm³ niet overschrijden en wordt verwacht tussen de 6-8 cm³. Op dit moment wordt de tumor gezien als een klinisch relevante tumor in context van tumor micro-omgeving. Na de 12 weken zullen de dieren door middel van beeldvorming gekwantificeerd worden en zal het experiment beëindigd worden. Hierdoor zal het ongerief matig niet worden overschreden.

Vraag 45: In de tabel lijkt bij "saline control" de injectie in de staarvene (1) te ontbreken. Aangepast

Vraag 46: Moet epilepsie niet ook meegenomen in de ongeriefscores met name voor de WAG/Rij-ratten?

Nee, we verwachten geen drop-out voor epilepsie.

Vraag 47: Kunt u 'laboured respiration' nader kwantificeren ondermeer ten aanzien van de frequentie?

Hier bedoelen we een vermoeijkte ademhaling mee die bij de dieren te herkennen zal zijn als een snellere, moeizame ademhaling voor een aantal dagen achter elkaar.

Aantallen & statistiek

Vraag 48: Het is niet duidelijk wat de gekozen read-outs zijn die de sample-size bepalen. Het lijkt of u one-size fits all toepast. Gaat $n=10$ wel genoeg zijn om subtiele gedragsveranderingen te meten, of gaat het m.n. om het vaststellen van aderverkalking en/of tumorgroei? U verwacht ook een HEP incidentie tot 10% dus het gaat om $n=9$ effectief per groep. Graag uw toelichting.

Het aantal dieren is berekend op basis van de doorslaggevende primaire uitleesparameter voor multimorbiditeit, namelijk tumorgroei. Op basis van onderstaande getallen (vraag 49) komt met zonder uitval op $n=9$ per groep, met uitval $n=10$ per groep.

Vraag 49: Uw onderbouwing van de aantallen is onvoldoende. U hebt verschillende primaire uitkomstmaten, gerelateerd aan plaquevorming, aderverkalking, tumorvorming, en gedrag. Toch werkt u met een generieke $d=30%$ en $s=20%$ voor alle parameters, wat niet erg plausibel is. Zou u dit nader kunnen uitwerken voor uw verschillende parameters, en aangeven, in geval u meerdere primaire uitkomstparameters per experiment hebt, welke het meest bepalend is?

De meest bepalende primaire uitkomstparameter voor multimorbiditeit is het ontstaan van een tumor. De $d=30%$ en $s=20%$ zijn gegenereerd uit voorgaande experimenten (Peeters et al, CCR 2015). Aangezien dit projectvoorstel in de eerste plaats gaat over het genereren van een multimorbide model, is in samenspraak met IvD gekozen om tumorgroei als doorslaggevende factor te gebruiken.

Vraag 50: Het is niet correct dat per definitie het aantal gebruikte dieren moet verdubbelen als beide geslachten gebruikt worden. Zie bv. de studie Buch et al. (2019) <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01774-0>. Het probleem is hier dat u eerst een generieke n berekent, en deze vervolgens vermenigvuldigt met 2 omdat u mannen en vrouwen wilt gebruiken. Geslacht moet echter al mee genomen worden in de berekening van de n. In een in silico scenario-analyse vond Buch et al. dat bij two-factor ANOVA's – met geslacht als een onafhankelijke variable - de N ten hoogste 33% hoger was t.o.v. een standaard one-factor ANOVA met slechts één van beide geslachten in experiment. Concreet kan dit een aanzienlijke reductie van dieren geven. Wat is uw visie hierop?

Buch et al. heeft deze data gebaseerd op analyses van bestaande data, wat inderdaad een reductie van dieren kan geven. Dit projectvoorstel wordt een trial, wat wil zeggen dat we een inschatting maken wat er uit gaat komen. We hebben geen voorafgaande data waarbij we een twee-factor ANOVA, met geslacht als een onafhankelijke variabele, kunnen meten. In dit geval kunnen we niet veel zeggen beide geslachten hetzelfde gaan reageren of anders. Ons projectvoorstel heeft duidelijke go/no-go momenten ingebouwd om te anticiperen op deze verschillen.

Vraag 51: Waarom komt het genoemde aantal dieren in de tabel (460) niet overeen met het aantal dieren genoemd in de tekst en NTS (440)?

Eerder veranderde aantallen zijn verkeerd overgenomen, het correcte aantal is 440 dieren.

Vraag 52: De groottes van de diergroepen in doelstelling 2 en 3 zijn gelijk. De geplande analyses zijn waarschijnlijk anders. Kunt u dit aub toelichten?

De primaire analyses in doelstelling 2 en 3 zijn gelijk, de secundaire analyses verschillen. Hierdoor blijven de groottes van de diergroepen hetzelfde.

Redactionele suggesties aanvraag

Alle suggesties zijn behandeld en daar waar nodig aangepast in het projectvoorstel, bijlage of NTS.

Bijlage 2:

5.1 lid2h **horing 28 oktober 2022**

Introductie

De aanvragers danken de 5.1 lid2h leden voor de uitnodiging en de mogelijkheid om de casus toe te lichten. Het betreft een aanvraag die al meer dan 2 jaar geleden is ingediend bij de IvD, al eerder beoordeeld is door de 5.1 lid2h en vervolgens ingetrokken is door de aanvragers i.v.m. een negatief 5.1 lid2h advies. De aanvragers hebben het PV herschreven en opnieuw ingediend.

Er zijn een aantal punten die de aanvragers mondeling wensen toe te lichten:

▪ **Verhelderen van het doel**

Het betreft een multimodaal onderzoek dat deels atherosclerose vaatverkalking combineert met kanker. Twee chronische ziekte die veel mensen wereldwijd krijgen, vaak voor een lange tijd en hierbij is het van belang dat het onderzoek verbeterd maar ook de diagnostiek en onze zorg. In dit model willen de aanvragers zich vooral richten op de biologische mechanisme. Dat komt omdat de literatuur die we nu hebben, vooral gebaseerd is op associaties (wat ontzettend belangrijk is). Deze halen ze uit patiënten data. Maar daarop kunnen ze niet focussen op het mechanisme die uiteindelijk leiden tot betere therapieën, betere patiëntenzorg en ook leidt tot mindere kosten in onze patiëntenzorg. De relevantie van dit projectvoorstel is echter de combinatie van een multimodaal model waarbij onderliggende mechanismes van meerdere chronische ziekten worden bestudeerd, specifiek atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Tevens wordt de invloed van (de combinatie van) deze ziekten op de mentale gezondheid bestudeerd.

▪ **De keuze voor de modellen**

De aanvragers gebruiken twee ratmodellen waar bewust voor gekozen is; WAR/Rij ratten en SD-ApoE ratten. De aanvragers hebben ervaring met de SD-ApoE ratten in het atherosclerose vaatverkalking onderzoek in muismodellen. Deze hebben met een hoog vet dieet kans op atherosclerose en met warfarine en vitamine K kans op vaatverkalking. De WAR/Rij ratten die met rhabdomyosarcoma cellen kans hebben op kankerontwikkeling of de implementatie van kanker. Tevens hebben de oudere lijnen kans op epilepsie, kans op dementie. Dit highlight het belang van het onderzoek dat deze ratten met multimodale ziektes de kans op mentale gezondheid verhoogd. Hiermee Er zijn nog enkele aanvullende vragen vanuit de 5.1 lid2h leden gesteld welke door de aanvragers beantwoord zijn.

Er zijn nog enkele aanvullende vragen vanuit de 5.1 lid2h leden gesteld welke door de aanvragers beantwoord zijn. Deze vragen hadden o.a. betrekking op het type model, statistiek en risico's.

Bijlage 3:

Aanvullende vraag 5.1 lid2h d.d. 02.11.2022 en Antwoorden VO 05.12.2022

Geachte prof. 5.1 lid2e

In de gedachtenwisseling op 28 oktober jl. tussen de bij PV 2022-003 betrokken onderzoekers en de 5.1 lid2h vatte de mening post bij de 5.1 lid2h dat naar uw idee er (nog) geen modellen van atherosclerose beschikbaar waren betreffende de diersoort rat en dat dientengevolge een poweranalyse teneinde de benodigde proefdieren optimaal te kunnen inschatten niet mogelijk was.

Eenvoudige raadpleging door de 5.1 lid2h van PubMed leverde vrij snel ondermeer de volgende publicaties op:

- Habila Obidah Abert et al. Effect of Green Synthesized Iron Oxide Nanoparticles Using Spinach Extract on Triton X-100-Induced Atherosclerosis in Rats. *Biochem Res Int.* 2022 Oct 7;2022:9311227. doi: 10.1155/2022/9311227. eCollection 2022.
- Lingmiao Wen et al. Differential Response of Ileal and Colonic Microbiota in Rats with High-Fat Diet-Induced Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 22;23(19):11154. doi: 10.3390/ijms231911154.
- Subramani Yuvaraj et al. Chrysin reduces hypercholesterolemia-mediated atherosclerosis through modulating oxidative stress, microflora, and apoptosis in experimental rats. *J Food Biochem.* 2022 Jul 27;e14349. doi: 10.1111/jfbc.14349. Online ahead of print.

Graag daarover uw mening en wel met name in hoeverre dergelijke publicaties van nut zouden kunnen zijn om de benodigde proefdieren optimaal te kunnen inschatten

Beste 5.1 lid2h

Vooreerst willen we u bedanken voor de mogelijkheid om ons project mondeling toe te lichten tijdens de 5.1 lid2h vergadering. We zijn van mening dat vele open vragen tijdens deze discussie opgehelderd zijn geworden. Dank om ook verder mee te denken over mogelijke rat modellen en beschreven atherosclerose onderzoek om het aantal nodige dieren beter te kunnen inschatten.

Onderstaande artikelen laten allemaal een atherosclerose model in de rat zien. Deze artikelen focussen zich op andere rattenstammen (Wister of Sprague-Dawley ratten) ten op zichte van ons projectvoorstel (ApoE^{-/-} ratten). Het eerste artikel geeft te weinig details om een goede poweranalyse uit te halen. De laatste twee artikelen gebruiken een experimentele periode van ±12-14 weken wat overeenkomt met ons projectvoorstel. Hierbij wordt wel de behandeling meegenomen van artikel 3 in de experimentele periode. Zoals aangegeven bij onze gedachtewisseling zien wij verschillen in relatie tot ApoE^{-/-} muizen en atherosclerose inductie wanneer dit wordt uitgevoerd in verschillende instituten, vandaar dat elk instituut zijn eigen protocol heeft om tot vergelijkbare resultaten te komen binnen studies uitgevoerd in hetzelfde instituut. Een poweranalyse kan berekend worden vanuit deze data, inachtnemend dat dit andere rattenstammen betreffen, hetgeen niet een directe representatie zal zijn naar de ApoE^{-/-} ratten en de atherosclerose inductie. Op basis van deze redenering blijven we bij onze eerste getallen.

1. **Habila Obidah Abert et al. Effect of Green Synthesized Iron Oxide Nanoparticles Using Spinach Extract on Triton X-100-Induced Atherosclerosis in Rats. Biochem Res Int. 2022 Oct 7;2022:9311227. doi: 10.1155/2022/9311227. eCollection 2022**

Deze studie gebruikt 30 mannelijke Wister ratten onderworpen aan een normaal dieet voor de normale condities. Voor de atherosclerose condities staat dat er eerst een pilot is uitgevoerd voor het vaststellen van de concentratie nanodeeltjes. Dit is een pilot waarbij 6 ratten worden gebruikt, omdat de condities om atherosclerose te induceren al vastgesteld zijn in een voorgaande studie → *“having already established the concentration that is effective for induction of atherosclerosis in a previous study”*. Aangezien wij in ons projectvoorstel een poweranalyse voor de inductie van atherosclerose nodig hebben is deze studie niet relevant, maar hun voorgaande studie wel. Deze studie is echter nooit gepubliceerd en gegevens zijn dus niet beschikbaar.

2. **Lingmiao Wen et al. Differential Response of Ileal and Colonic Microbiota in Rats with High-Fat Diet-Induced Atherosclerosis. Int J Mol Sci. 2022 Sep 22;23(19):11154. doi: 10.3390/ijms231911154.**

Deze studie heeft 16 specifieke mannelijke pathogeen-vrije Sprague-Dawley ratten gebruikt. Het atherosclerose model (n=8) omvat een hoog vet dieet, waarbij een controlegroep (n=8) met een normaal dieet is meegenomen. De dieren zijn gemonitord voor een periode van 14 weken. Atherosclerose is geanalyseerd in de aorta, ileum en colon na opoffering met immunohistochemistry en PCR.

3. **Subramani Yuvaraj et al. Chrysin reduces hypercholesterolemia-mediated atherosclerosis through modulating oxidative stress, microflora, and apoptosis in experimental rats. J Food Biochem. 2022 Jul 27;e14349. doi: 10.1111/jfbc.14349. Online ahead of print.**

Deze studie gebruikt mannelijke Wistar ratten in verschillende groepen waarbij de atherosclerose groepen een hoog vet dieet krijgen voor 60 dagen. Na 60 dagen is een behandeling van 30 dagen ingezet met Chrysin of Atorvastatine om te kijken wat het resultaat op atherosclerose is.



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h									
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen									
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3 <input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1 <input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2									
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h								
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	<table border="1"> <tr> <td>Titel</td> <td>Voorletters</td> <td>Achternaam</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw</td> </tr> <tr> <td colspan="3">5.1 lid2e</td> <td></td> </tr> </table>	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw	5.1 lid2e			
Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw								
5.1 lid2e											
		E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e								
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	<table border="1"> <tr> <td>Titel</td> <td>Voorletters</td> <td>Achternaam</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw</td> </tr> <tr> <td colspan="3"></td> <td></td> </tr> </table>	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw				
Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw								
		E-mailadres gemachtigde									
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	5.1 lid2h 4-6								
		Postcode en plaats	5.1 lid2h								
		Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h								
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.								
		Functie	5.1 lid2h								
		Afdeling	5.1 lid2h								

	Telefoonnummer	5.1 lid2e	
	E-mailadres	5.1 lid2e	
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	5.1 lid2e
		Afdeling	5.1 lid2h
		Telefoonnummer	5.1 lid2e
		E-mailadres	5.1 lid2e
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	5.1 lid2h
		E-mailadres	5.1 lid2h
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum: 01 - 08 - 2022 Einddatum (t/m): 30 - 07 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Opzetten van een multi-modaal diermodel met hart- en vaatziekten en kanker met mentale gezondheidsklachten
3.4		Naam DEC: 5.1 lid2h Postadres: 5.1 lid2h

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:
30980069N

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

5.1 lid2e

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

14-07-2022

Handtekening

5.1 lid2e



Centrale Commissie Dierproeven

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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

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 animal
- 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 2.1.

Owing to recent advances in clinical care, the average life expectancy has dramatically increased all over the world in recent years. Consequently, more and more previously life-threatening conditions (e.g. cancer (1) and coronary heart disease (2)) have developed into chronic diseases requiring long-term treatment

and follow-up (3-5). According to the World Health Organization (WHO), chronic diseases cause 71% of all deaths globally. Due to the aging population, more-and-more patients are presenting with multiple coexisting chronic conditions referred to as multimorbidity (6-12). Multi-morbidity, e.g., including the co-occurrence of cancer and cardiovascular disease (CVD), likely affects mortality, disease progression, disease stage at diagnosis, treatment and/or outcome of the underlying diseases (9, 13). Moreover, such debilitating conditions are also often accompanied by the development of cognitive and/or affective problems, e.g., leading to the development of mental health disorders such as major depression. Additionally, multimorbid patients often require complex health care and hence account for a relatively high proportion of healthcare costs/workload (8, 9, 13, 14).

CVD

In 2019, CVD was responsible for approximately 17.9 million deaths, whereby atherosclerosis and vascular calcification represent the majority of cardiovascular mortality. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease in which the artery narrows due to buildup of low-density lipoproteins. This buildup can cause ischemic heart disease, strokes, and peripheral vascular disease (15). Additionally, two types of vascular calcification can be distinguished by their location and associate with atherosclerotic plaque formation: intimal and medial calcification. Intimal calcification is located in the vessel intima and is associated with atherosclerosis by cellular necrosis, inflammation and lipid deposition, whereas medial calcification is prominent in the medial layer and is associated with type 2 diabetes (16).

Cancer

Cancer is the second leading cause of death globally and is responsible for an estimated approx. 10 million deaths in 2020 (17). Early detection and enhanced treatment options of cancer have led to increasing numbers of cancer survivors worldwide. Many research efforts are focused on elucidating the molecular mechanisms underlying carcinogenesis, including PD-1/CTLA-4, CCR, cytokines, P53, Notch and Wnt signaling pathways (18). Nonetheless, long-term adverse effects of cancer and anticancer treatment that affect patient survival and quality of life are unclear (6).

Mental health

Mental disorders are known to represent a major public health problem that affects patients, society, and nations as a whole. Globally, approximately 29% of all people experience a common mental disorder at some time during their lifetimes (19). Patients can be expected to develop mental disorders in response to other diseases, which will be addressed further below. More specifically, cancer patients have an elevated risk for mood and anxiety disorders, a relationship which will be addressed in this proposal (20).

Relationship between CVD, cancer and mental health

CVDs and cancer are the top two health threatening disorders worldwide, whereby their interaction with each other and their influence on mental health is uncertain (12). In the past years, epidemiological studies addressed many factors that are involved in CVD, cancer, and mental health. Although cancer can cause atherosclerosis and vascular calcification through different mechanisms, the most common are antitumor drugs and radiotherapy (RT), whereby chest RT increases the risk of ischemic heart disease with 5- to 10-fold. However, patients with cancer often have metabolic and vascular abnormalities (21). According to a recent cohort study, the incidence of cancer is 3.1% in atherosclerosis patients during a mean follow-up of 33 months (21). A diagnosis of cancer is associated with the development of vascular calcification and atherosclerosis (22). Therefore, the term cardio-oncology arises around 2018 as a new profession, which combines cardiovascular diseases with cancer types. Although this subject is very broad and complicated due to the different cardiovascular diseases that can interact with different cancer types, it is very important that we investigate this subject for future therapies and patients. Looking at the influence on mental health, cancer patients have an elevated risk for mood and anxiety disorders, whereby the most common risk factors were female sex and older age at diagnosis (20). The prevalence of anxiety disorders in cancer patients is 23.4%, whereby anxiety disorders were most prevalent in lung cancer patients (23). We will address a few factors below that are of interest in this proposal (Figure 1).

Risk factors

Shared risk factor for CVD and cancer are: age, sex, smoking, obesity, diet, and genetics, whereby CVD and cancer influence mental health. Smoking is a well-known risk factor for CVD and cancer, whereby the mortality risk increases 2- to 3-fold of death in smokers compared to nonsmokers. Smoking causes vascular constriction and affects blood pressure, lipid metabolism and the coagulation system. A recent study showed that smoking has a dose-response relationship with atherosclerosis and that cessation substantially lowers the risk of disease development (24). Furthermore, nicotine promotes vascular calcification in vascular smooth muscle cells (VSMCs), which are important cell types involved in atherosclerosis (25). Regarding to cancer, smoking increases the risk of cancer at 14 different sites, in which new insights link both breast and prostate cancer to smoking (26). Therefore, smoking plays an important role in both CVD and cancer. Due to a poor diet and sedentary lifestyle, the rising rates of obesity, increases the risk for both CVD and cancer. Lipid accumulation in the body results in chronic inflammation and lipid accumulation in the vessels, leading to atherosclerosis development. In addition, long-term cohort studies suggest that obesity increases the risk of cancer with 14% in men and 20% in women (26).

Inflammatory theory

Cells are very plastic and change during course of disease. Atherosclerosis and cancer are both characterized by low-grade, chronic inflammation, whereas inflammation serves as a risk factor for development of mood and anxiety disorders. During the first stages of atherosclerosis, apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins trigger activation of the intimal layer. This process attracts various kinds of inflammatory cells, notably monocytes-derived macrophages, T lymphocytes and mast cells. Developing atherosclerotic lesions also include monocyte-derived dendritic cells, various subsets of B lymphocytes and, neutrophils (27). The inflammatory response amplification is also seen during mood and anxiety disorders, characterized by an increased expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors, increased levels of acute-phase reactants, chemokines and soluble adhesion molecules in the circulation and cerebrospinal fluid (28). When acute inflammation is not resolved in time, it can transform into chronic inflammation resulting in an immunosuppressive microenvironment. This environment is characterized by immunosuppressive cells, including M2 macrophages, Treg cells and myeloid-derived suppressor cells. These changes increase the risk to activate oncogenes, DNA and protein damage, release of reactive oxygen species (ROS), and affect multiple signaling pathways including NF- κ B, K-RAS, and P53, leading to chronic diseases, including cancer. Contradictory, inflammation does not only promote the immune response (acute inflammation) but can also lead to immune surveillance (chronic inflammation) in cancer. During acute inflammation, mature dendritic cells can regulate anti-tumor immune responses by inducing inflammatory responses via multiple mechanisms (e.g., cross-presenting the tumor antigens and priming tumor-specific CD8⁺ T cells), whereas chronic inflammation leads to recruitment of immunosuppressive cells (29, 30).

Matrix

Tissues are composed of multiple cell types, including fibroblasts, endothelial cells, and VSMCs. VSMCs are the major cell type present at all stages of atherosclerosis, hence functions of VSMCs in plaques have been underestimated over the years. Atherosclerosis is characterized by the phenotypic alteration of VSMCs, depending on different factors, including stress. Research showed that VSMCs can adopt alternative phenotypes, including phenotypes that resemble foam cells, macrophages, mesenchymal stem cells and osteochondrogenic cells which can influence atherosclerotic plaque progression (31). When altered towards an osteochondrogenic phenotype, vascular calcification is induced, increasing the risk of thrombus formation¹⁸. However, the mechanisms behind these specific phenotypes remain unknown.

Commented 5.1.2021(1): Sex refereert naar het biologische aspect terwijl gender refereert naar hoe iemand zich identificeert. In dit rijtje gaat het er juist om dat vrouwen en mannen onder andere een andere hormoonhuishouding hebben, dus biologisch gezien verschillen. Vandaar de keuze: sex.

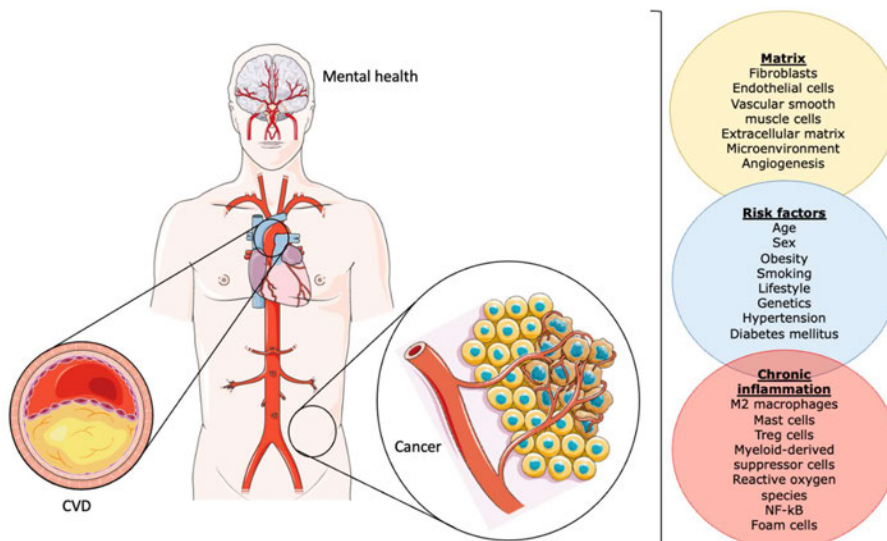


Figure 1: Multimorbidity between CVD, cancer, and its influence on mental health. CVD and cancer are the two major chronic diseases, whereby the influence on mental health is to be investigated. This proposal will focus on atherosclerosis and vascular calcification. On the right, the overlapping factors from different categories between CVD, cancer, and mental health are depicted, which indicate factors that could be entangled and/or influence each other.

Previous research

Although our clinical care prolongs life, multimorbidity results in decreased quality of life. The current knowledge of multi-morbidity is derived from patient data, which is limited and mostly associative. Clinical data shows that cancer survivors are at increased risk of CVD, related to treatment induced adverse effects, and have a 2-6 times higher risk of cardiovascular mortality (7). Over the past years, due to increasing life expectancy, clinical care has shifted from treatment of CVD to prevention and early detection. Interactions between morbidities and the consequences of these interactions for treatment are currently not studied in fundamental research. Additionally, studying the causal interaction between the morbidities in the clinical setting is far from ideal, due to the complexity of the diseases and the required expertise. Therefore, the development and use of a multi-modal animal model is a necessity for future research. As such, examining how comorbidities drive diseases could be valuable since it may reveal unknown fundamental pathways and provide new therapeutic angles that could, in the future, translate to the clinic. Several animal models for multi-morbidity have been published in recent years (32-36) including animal models combining CVD and renal failure (11), CVD and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (33), hypertension and stroke (34) and CVD/COPD and smoking (35). However, these models do not combine CVD, cancer, and mental health. Accordingly, the current proposal aims to develop a rat multi-model disease model that combines CVD and cancer and their influence on mental health, ultimately leading to new therapeutic targets for both diseases.

Overall purpose of this research

In summary, the novelty of our approach is the establishment of a multi-modal disease model whereby the underlying molecular and biological mechanisms of multiple chronic disease, in particular atherosclerosis, vascular calcification, and cancer can be studied.

In this application, we describe the *in vivo* experiments that are necessary to allow successful establishment of the model. Hereby, we define 'vascular disorders' as the combination of atherosclerosis and vascular calcification throughout the rest of the proposal. The key features of this application include:

- (1) Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats;
- (2) Establish a multi-morbidity model containing vascular disorders and cancer;
- (3) Focus on the underlying mechanism between vascular disorders and cancer
- (4) Assess the consequences of multi-morbidity on mental health

Hereby, the first aim focusses on the establishment of a vascular disorder model in rats, as research for CVD is mostly based on mouse models. The rat has been chosen as species based on our extensive experience within cancer therapy, imaging, and experiments addressing mental health (37-39). When successfully established in one or both rat strains, the multi-morbidity model will be established. Based on our own *in vitro* and *in vivo* data, as well as published data of others, we have been able to apply the principle of the three R's for the above-mentioned aims. Throughout the application, we will indicate where and how we have used principles of replacement, refinement, and reduction. The complication of combining atherosclerosis, vascular calcification, cancer, and mental health requires state-of-the-art quantification techniques for plaque build-up and cancer growth. Therefore, terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy will be used in this proposal. In addition, cognition and effect-related behavioral testing will be performed to assess the mental health of the animals. Where appropriate, clear go/no-go decisions will be indicated.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Ultimate goal

We aim to establish a multi-modal disease model studying the molecular and biological effects of atherosclerosis, vascular calcification, and cancer. This pilot will provide important information on the interaction between those diseases.

Aim 1. Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

The first aim is very important for the establishment of the multi-model disease model, since we aim to achieve a model containing atherosclerosis, vascular calcification, and tumour growth, which is only achievable when the required level of atherosclerosis and vascular calcification is met (any form of plaque build-up) (40, 41). For this purpose, the disorder levels will be determined via terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for these specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. To achieve this aim, we have defined a set of immediate sub-aims (a detailed description is provided in section 3.4.):

1.1 Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

These experiments will determine to what extent atherosclerosis can be established in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.1, Figure 2).

1.2 Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

These experiments will determine to what extent calcification can be established in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.2, Figure 2).

1.3 Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

These experiments will determine to what extent atherosclerosis and vascular calcification can be induced in one model, establishing a **vascular disorder** model. This model will be further used in aim 2 (Figure 2).

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing vascular disorders and cancer

When the experimental approach leading to atherosclerosis and vessel calcification has been determined, aim 2 will be conducted to establish tumour growth in addition to atherosclerosis and vascular calcification pathologies (37). These experiments will determine to what extent **vascular disorders** can be combined with cancer in one model, multi-morbidity model, combining the two most health **treating** disorders.

Aim 3. Study the underlying mechanisms between vascular disorders and cancer

When the experimental approach leading to a multi-morbidity model has been determined, aim 3 will be conducted to further discover the underlying mechanism connecting these pathologies. To achieve this aim, we have defined a set of immediate sub-aims (a detailed description is provided in section 3.4.):

3.1 Establish a multi-morbidity model with atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats
The established atherosclerosis model of aim 1.1 will be extended by induction of cancer in WAG/Rij and/or SD- Apoe^{tm1sage} rats.

3.2 Establish a multi-morbidity model with calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats
One or both **rat strains** from aim 1.2 are selected to determine to what extent calcification and cancer can be established in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats.

Aim 4. Study the influence of atherosclerosis, vascular calcification and/or cancer on mental health

To study if **vascular disorders** and tumor growth affects the well-being of the animals affect cognition and affect-related behaviors, several non-invasive behavioral tests will be performed. More specifically, for this purpose, during all three aims, before exposing the animals to the various imaging modalities, the cognition- and affect-related behavioral effects of genetic variation (WAG/Rij & SD-Apoe^{tm1sage}) and the distinct (phased) interventions (atherosclerosis, vessel calcification and tumorigenesis) will be examined to assess to which extent physical multi-morbidity in the context of this project contributes to variations in mental health of the animals. To control for physical limitations that may impact on performance in the various behavioural test, overall locomotor performance will be studied as well (42). This aim will be implemented over all three aims.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The aims formulated here are direct consequences of previous and ongoing work within our group and our collaborators. Our groups consist of highly motivated and skilled senior scientists, postdocs, PhD-students and technicians, which are certified experts in the execution of animal experiments. The proposed research will be executed by 1 PhD student, with the help of technicians experienced in animal and imaging experiments. Our groups are experts in the field of cardiology, oncology, mental health and imaging, as can be judged by our work published in many peer-reviewed publications (e.g., in the past 4 years, the involved principal investigators published 160 articles in international journals). The project summarized here has been positively judged by the faculty and the research institutes, who provide the necessary budget to execute these experiments. The technical procedures summarized in this proposal are routinely performed in our lab, evidenced by the competency files of our employees. Dedicated technical staff will handle animals and all experiments will be carried out by experienced scientists/technicians with the appropriate certificates and hands-on experience, which will ensure adherence to the principles of replacement, reduction, and refinement. All equipment needed for animal experimentation is accessible, and animal models required for performing the research described here are available in **5.1 lid2h**

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

Commented [5.1 lid2h](2): We hebben hier gekozen voor een aparte aim met du delijke go/no-go momenten. Een no-go in aim 2 zal daarom lijden tot geen uitvoering van aim 3. Daarnaast maakt deze opzet de indiening van de werkprotocollen makkelijker later.

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

In the current aging population, more and more patients present with multi-morbidity, i.e., with multiple co-existing chronic diseases. It has been shown that patients that are presented to the clinic with a chronic disease will develop a second chronic condition with a very high likelihood. We want to investigate why there is a great chance of having multiple chronic disorders. It is likely that the chronic diseases with these patients present interact. There are 7 major groups of chronic disease, whereby vascular diseases, cancer, and **mental disorders** are three of them. However, interactions between atherosclerosis, vascular calcification, mental disorders, and cancer have not been studied in detail even though e.g., cancer patients/survivors often also suffer from cardiovascular disease (8, 43-46). A potential shared mechanism of chronic diseases is senescence or pre-mature ageing of stem cells accounting for multiple diseases.

Society as a whole is suffering from increased healthcare costs which are at least partly due to increasing numbers of patients that present with multi-morbidities and chronic disease. Additionally, expenditures per capita increase dramatically in patients with a chronic condition. It is estimated that approximately 83% of all healthcare money is spent on chronic conditions, five times larger compared to patient without chronic disease (47).

By sharing our work to other scientists and clinicians, we will contribute to a vital, dynamic and transparent knowledge sharing culture. Moreover, with our research, we aim to establish an animal model for multi-morbidity in order to study interactions between pathologies.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

This project is funded by multiple departments at **5.1 lid2h**, which includes: **5.1 lid2h**

Each of the research schools has experts in different fields: cardiology, oncology, **mental disorders** and imaging. Scientists and their respective research institutes and universities will benefit from the outcome of this proposal as the multi-modal disease model will guide them in the further understanding of the underlying mechanisms between the different diseases.

The other stakeholder of this project is experimental animals and patients. To achieve our specific aims, we will use WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats. Animals will be negatively affected as they suffer discomfort from the different procedures during the experiments. At the end of the experiments, organs will be harvested for further molecular investigations to identify molecular mechanism. The experimental design and all experimentation procedures will be performed according to the 3R's principles (see below) by qualified personnel. Furthermore, the knowledge that is gathered within this proposal can contribute to better treatment options and future therapies, not only for **vascular disorders, cancer, and mental disorders** patients, but for multi-morbidity patients with **atherosclerosis, vascular calcification, and cancer**, thereby considering the influence on mental health.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

To reach our main objective, i.e., to establish a multi-modal disease model studying the effects of atherosclerosis, vascular calcification and cancer to one another, we have formulated the following overall milestones:

- (1) Establish a **vascular disorder** model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats;
- (2) Establish a multi-morbidity model containing **vascular disorders** and cancer;
- (3) Focus on the underlying mechanism between **vascular disorders** and cancer
- (4) Asses the consequences of multi-morbidity on mental health

The experimental approach is outlined in **Figure 2/3/4**.

Aim 1. Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

To achieve this aim, two different rat models will be studied to see which one results in substantial atherosclerosis development. Pre-selection of the rat models is based on their tumor susceptibility and development without extensive metastasis. The two selected rat models are:

- (5) WAG/Rij rats (commercially available from licensed breeder; not susceptible for atherosclerosis development) in which an AAV8 vector expressing PCSK9 (commercially available; which decreases LDLr expression and therefore enhances cholesterol sensitivity) will be injected
- (6) SD-Apoe^{tm1sage} rats (commercially available atherosclerosis model from licensed breeder; susceptible for atherosclerosis development).

Aim 1.1. Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For aim 1.1, groups will either receive a **western type diet (WTD)** or chow diet at the age of 8-10 weeks, whereby a chow diet serves as a control for SD-Apoe^{tm1sage} rats due to their susceptibility for atherosclerosis development. Next, the extent of atherosclerosis will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for specific disease pathways, i.e., apoptosis (anxA5), hypoxia (18F-HX4), inflammation (Rantes and 18FDG) that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, atherosclerosis will be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (**see Appendix 1, and Figure 2**) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments. Specifically, if there was no quantifiable effect on atherosclerotic plaque formation, animals will not be used in experimental aim 1.3 and 3.1 (**go/no-go decision, Figure 2**).

Decision strategy aim 1.1:

- (7) For each rat model, when no atherosclerosis yield is present, aim 2 will not be investigated for that model

Intended results aim 1.1:

- (8) We will determine to what extent atherosclerosis can be induced in WAG/Rij or/and SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent.
- (9) Determine the effect of atherosclerosis on the animal's mental health

Aim 1.2. Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

WAG/Rij rats will receive a WTD diet, whereas SD-Apoe^{tm1sage} rats will receive a chow diet at the age of 8-10 weeks. Calcification will be induced via diet supplemented warfarin (VKA) and vitamin K₁. Next, the extent of calcification will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for specific disease pathways, i.e., apoptosis (anxA5), calcification (Na18F and fetuin-A), hypoxia (18F-HX4), inflammation (Rantes and 18FDG) that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, calcification will be studied using other parameters (e.g., immunohistochemistry) (see **Appendix 1, and Figure 2**) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments. Specifically, if there was no quantifiable effect on calcification (medial or intimal), animals will not be used in experimental aim 1.3 and 3.1 (**go/no-go decision, Figure 2**).

Decision strategy aim 1.2:

- (10) For each rat model, when no vascular calcification yield is present, aim 2 will not be investigated for that model

Intended results aim 1.2:

- (11) We will determine vascular calcification can be induced in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent.
- (12) Determine the effect of vascular calcification on the animal's mental health

Aim 1.3. Establish a vascular disorder model, combining atherosclerosis and calcification, in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

In these experiments, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be used in experiments aimed to established atherosclerosis and, simultaneously, vessel calcification. For that purpose, the animals will receive a WTD or WTD enriched with warfarin (VKA) and vitamin K₁. Afterwards, the extent of atherosclerosis and vascular calcification, and the influence on each other, will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes for specific disease pathways, i.e., apoptosis, calcification, hypoxia, inflammation) that will be tested in sequential analysis. In addition, atherosclerosis and vascular calcification will be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (see Appendix 1, and Figure 2) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments animals to proceed. Specifically, if there was no quantifiable effect on atherosclerotic plaque formation/calcification, animals will not be used in experimental aim 2 (**go/no-go decision, Figure 2**).

Decision strategy aim 1.3:

- (13) For each rat model, when no atherosclerosis and vascular calcification yield is present, aim 2 will not be investigated for that model

Intended results aim 1.3:

- (14) We will determine to what extent atherosclerosis and vascular calcification can be induced in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent
- (15) Determine the effect of atherosclerosis and vascular calcification on the animal's mental health

During the experiments, in the last three weeks prior to imaging, the animals will be exposed to several non-invasive behavioral tests to investigate the effect of multi-morbidity on the animal's mental health. First of all, cognitive performance of the animals will be tested using the Y-maze continuous alternation test and the object recognition test. Motor performance as well as anxiety-related behaviour will be scored using open field testing. Anxiety-related behaviour will be further examined using the elevated zero maze test, whereas anhedonia (as a measure of depressive-like behaviour) will be assessed using the sucrose preference test. Physical disorders involving atherosclerosis and tumor growth are likely to affect mental health. In order to map model-induced effects on mental health, several non-invasive behavioral cognition- and affect-related tests will be performed.

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing vascular disorders and cancer

In these experiments, rats (WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, depending on go/no-go decision), will be used in experiments aimed to established atherosclerosis and, simultaneously, vessel calcification. For that purpose, the animals will receive a WTD or WTD enriched with warfarin (VKA) and vitamin K₁. During the diets the animals will also (depending on the animal strain) be subjected to either implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas (WAG/Rij) or injected with RK3E-ras cells (SD-Apoe^{tm1sage}). Afterwards, the extent of atherosclerosis, vascular calcification, and cancer, and the influence on each other, will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes (see above) for specific disease pathways (i.e. apoptosis, calcification, hypoxia, inflammation) that will be tested in sequential analysis. In addition, disease presence will also be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (see Appendix 1, and Figure 3) that will allow determining which group(s) of rats to use in future experiments animals to proceed. Only if a multi-morbidity model is

accomplished, aim 3 will be performed to investigate the molecular mechanisms (**go/go-no decision, Figure 3**). Non-invasive behavioral tests will be performed as described in aim 1.

Decision strategy aim 2:

- (16) For each rat model, when no **atherosclerosis, vascular calcification**, and tumor growth yield is present, aim 3 will not be investigated for that model

Intended results aim 2:

- (17) We will determine to what extent **atherosclerosis, vascular calcification**, and cancer can be induced in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats, which might be model dependent
- (18) Determine the effect of **atherosclerosis, vascular calcification**, and cancer on the animal's mental health

Aim 3. Study the underlying mechanisms between atherosclerosis or vascular calcification and cancer

Aim 3.1. Study the underlying mechanisms between atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For aim 3.1, groups will either receive a WTD or chow diet at the age of 8-10 weeks, whereby a chow diet serves as a control for SD-Apoe^{tm1sage} rats due to their susceptibility for atherosclerosis development. During the diets the animals will also (depending on the animal strain) be subjected to either implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas (WAG/Rij) or injected with RK3E-ras cells (SD-Apoe^{tm1sage}). Next, the disease extent will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes (see above) for specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, disease presence will be studied using other parameters (e.g., cholesterol measurements and immunohistochemistry) (see **Appendix 1, and Figure 4**) to acquire information about the underlying mechanisms. Non-invasive behavioral tests will be performed as described in aim 1.

Intended results aim 3.1:

- (19) Determine underlying mechanisms of multi-modal disease for atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats
- (20) Determine the effect of atherosclerosis and cancer on the animal's mental health

Aim 3.2. Study the underlying mechanisms between calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

WAG/Rij rats will receive a WTD diet, whereas SD-Apoe^{tm1sage} rats will receive a chow diet at the age of 8-10 weeks. Calcification will be induced via diet supplemented warfarin (VKA) and vitamin K₁. During the diets the animals will also (depending on the animal strain) be subjected to either implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas (WAG/Rij) or injected with RK3E-ras cells (SD-Apoe^{tm1sage}). Next, the disease extent will be studied using terminal PET/SPECT and 2-photon intravital microscopy experiments with probes (see above) for specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. In addition, disease presence will be studied using other parameters (e.g., immunohistochemistry) (see **Appendix 1, and Figure 4**) to acquire information about the underlying mechanisms. Non-invasive behavioral tests will be performed as described in aim 1.

Intended results aim 3.2:

- (21) Determine underlying mechanisms of multi-modal disease for calcification and cancer in WAG/Rij and/or SD-Apoe^{tm1sage} rats
- (22) Determine the effect of calcification and cancer on the animal's mental health

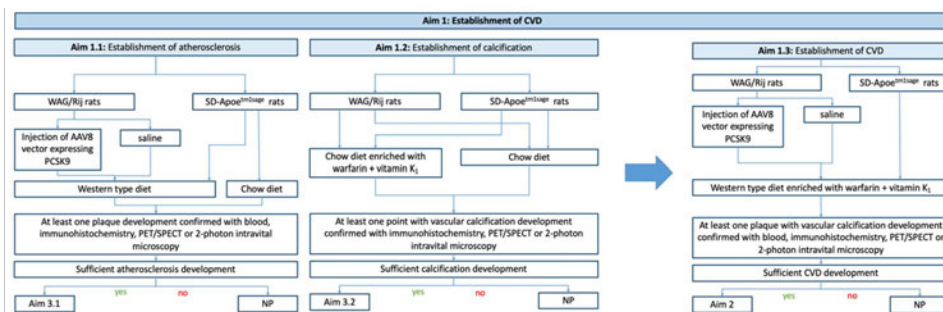


Figure 2: GO/no-GO flow chart with decision tree for aim 1 No progression; NP

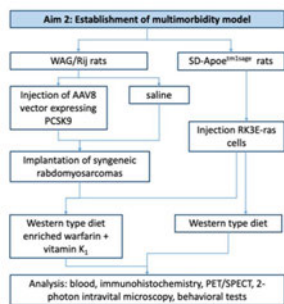


Figure 3: GO/no-GO flow chart with decision tree for aim 2 No progression; NP

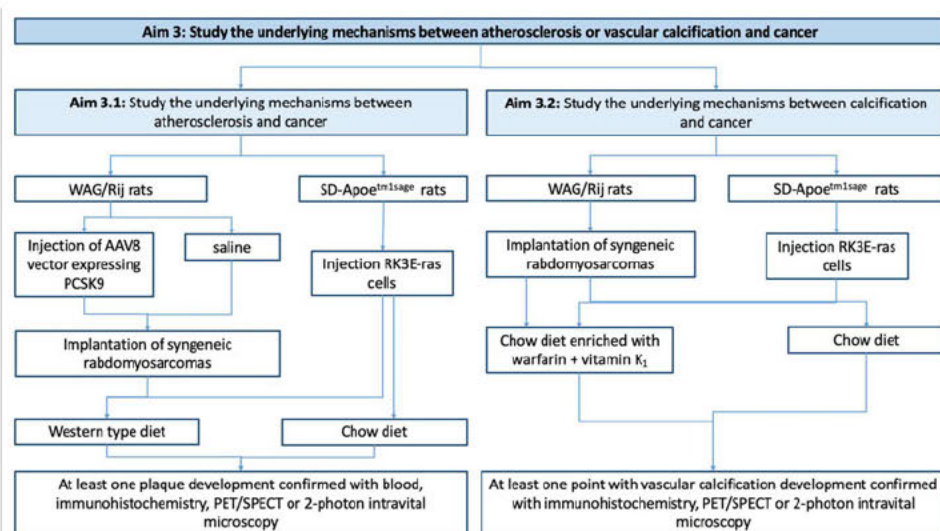


Figure 4: Experimental set-up for aim 3

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

This is a project proposal aimed at addressing four main questions:

- (1) Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-ApoE^{tm1sage} rats;
- (2) Establish a multi-morbidity model containing vascular disorders and cancer;
- (3) Focus on the underlying mechanism between vascular disorders and cancer
- (4) Asses the consequences of multi-morbidity on mental health

As described above in more details, the proposal follows a logical order (Figure 2, 3 and 4) from the experiments to define the optimal model in a stepwise approach, with clear Go/no-Go decisions. Only the model with effective development of atherosclerosis and vascular calcification will be further investigated in aim 2 and 3.

For all the described aims and sub-aims, an overview of models, experimental procedures and anticipated discomfort is listed in Appendix 1.

3.4.3 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	Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health.
2	
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	

References

1. Phillips JL, and Currow DC. Cancer as a chronic disease. *Collegian* 2010;17(2):47-50.
2. Mensah GA, Wei GS, Sorlie PD, Fine LJ, Rosenberg Y, Kaufmann PG, et al. Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications. *Circ Res* 2017;120(2):366-80.
3. Eurostat S. Mortality and life expectancy statistics. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Mortality_and_life_expectancy_statistics. Accessed 23-01-2021.
4. Population Division WpP. Probabilistic Projections of female life expectancy at birth using life expectancy at birth estimates. <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/EX/Female/900>.
5. Population Division WpP. Probabilistic Projections of male life expectancy at birth using life expectancy at birth estimates. <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/EX/Male/900>. Accessed 26-01-2022.
6. Teske AJ, Linschoten M, Kamphuis JAM, Naaktgeboren WR, Leiner T, van der Wall E, et al. Cardio-oncology: an overview on outpatient management and future developments. *Neth Heart J* 2018;26(11):521-32.
7. Kamphuis JAM, Linschoten M, Cramer MJ, Alsemgeest F, van Kessel DJW, Urgel K, et al. ONCOR: design of the Dutch cardio-oncology registry. *Neth Heart J* 2021;29(5):288-94.
8. Barnett K, Mercer SW, Norbury M, Watt G, Wyke S, and Guthrie B. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet* 2012;380(9836):37-43.
9. Nunes BP, Souza ASS, Nogueira J, Andrade FB, Thume E, Teixeira D, et al. Multimorbidity and population at risk for severe COVID-19 in the Brazilian Longitudinal Study of Aging. *Cad Saude Publica* 2020;36(12):e00129620.
10. Shao M, Lin X, Jiang D, Tian H, Xu Y, Wang L, et al. Depression and cardiovascular disease: Shared molecular mechanisms and clinical implications. *Psychiatry Res* 2020;285:112802.
11. Young K, and Singh G. Biological Mechanisms of Cancer-Induced Depression. *Front Psychiatry* 2018;9:299.
12. Organization WH. Noncommunicable diseases. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. Accessed 21-12-2021.
13. Organization WH. Multimorbidity. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252275/9789241511650-eng.pdf>. Accessed 21-12-2021.
14. Wammes JJG, Tanke M, Jonkers W, Westert GP, Van der Wees P, and Jeurissen PP. Characteristics and healthcare utilisation patterns of high-cost beneficiaries in the Netherlands: a cross-sectional claims database study. *BMJ Open* 2017;7(11):e017775.
15. Kobiyama K, and Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res* 2018;123(10):1118-20.
16. Mizobuchi M, Towler D, and Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(7):1453-64.
17. Organization WH. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Accessed 22-12-2021.
18. Xu X, Balk SP, Isaacs WB, and Ma J. Calcium signaling: an underlying link between cardiac disease and carcinogenesis. *Cell Biosci* 2018;8:39.
19. Steel Z, Marnane C, Iranpour C, Chey T, Jackson JW, Patel V, et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int J Epidemiol* 2014;43(2):476-93.

20. De R, Zabih V, Kurdyak P, Sutradhar R, Nathan PC, McBride ML, et al. Psychiatric Disorders in Adolescent and Young Adult-Onset Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adolesc Young Adult Oncol* 2020;9(1):12-22.
21. Raposeiras Roubin S, and Cordero A. The Two-way Relationship Between Cancer and Atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2019;72(6):487-94.
22. Whitlock MC, Yeboah J, Burke GL, Chen H, Klepin HD, and Hundley WG. Cancer and Its Association With the Development of Coronary Artery Calcification: An Assessment From the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2015;4(11).
23. Naser AY, Hameed AN, Mustafa N, Alwafi H, Dahmash EZ, Alyami HS, et al. Depression and Anxiety in Patients With Cancer: A Cross-Sectional Study. *Front Psychol* 2021;12:585534.
24. Ding N, Sang Y, Chen J, Ballew SH, Kalbaugh CA, Salameh MJ, et al. Cigarette Smoking, Smoking Cessation, and Long-Term Risk of 3 Major Atherosclerotic Diseases. *J Am Coll Cardiol* 2019;74(4):498-507.
25. Petsophonsakul P, Burgmaier M, Willems B, Heeneman S, Stadler N, Gremse F, et al. Nicotine promotes vascular calcification via intracellular Ca²⁺-mediated, Nox5-induced oxidative stress and extracellular vesicle release in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2021.
26. Johnson CB, Davis MK, Law A, and Sulpher J. Shared Risk Factors for Cardiovascular Disease and Cancer: Implications for Preventive Health and Clinical Care in Oncology Patients. *Can J Cardiol* 2016;32(7):900-7.
27. Back M, Yurdagul A, Jr., Tabas I, Oorni K, and Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol* 2019;16(7):389-406.
28. Miller AH, and Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol* 2016;16(1):22-34.
29. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6(1):263.
30. Liu L, Zhang SX, Liao W, Farhoodi HP, Wong CW, Chen CC, et al. Mechanoresponsive stem cells to target cancer metastases through biophysical cues. *Sci Transl Med* 2017;9(400).
31. Basatemur GL, Jorgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, and Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2019;16(12):727-44.
32. Hewitson TD, Holt SG, and Smith ER. Animal Models to Study Links between Cardiovascular Disease and Renal Failure and Their Relevance to Human Pathology. *Front Immunol* 2015;6:465.
33. Khedoe PP, Rensen PC, Berbee JF, and Hiemstra PS. Murine models of cardiovascular comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;310(11):L1011-27.
34. Cho S, and Yang J. What Do Experimental Models Teach Us About Comorbidities in Stroke? *Stroke* 2018;49(2):501-7.
35. Lo Sasso G, Schlage WK, Boue S, Veljkovic E, Peitsch MC, and Hoeng J. The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med* 2016;14(1):146.
36. AlSiraj Y, Chen X, Thatcher SE, Temel RE, Cai L, Blalock E, et al. XX sex chromosome complement promotes atherosclerosis in mice. *Nat Commun* 2019;10(1):2631.
37. Dubois L, Landuyt W, Haustermans K, Dupont P, Bormans G, Vermaelen P, et al. Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [(18)F]fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. *Br J Cancer* 2004;91(11):1947-54.
38. Barendsen GW, and Broerse JJ. Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV x-rays. I. Effects of single exposures. *Eur J Cancer* 1969;5(4):373-91.
39. Kim SA, Kim HW, Kim DK, Kim SG, Park JC, Kang DW, et al. Rapid induction of malignant tumor in Sprague-Dawley rats by injection of RK3E-ras cells. *Cancer Lett* 2006;235(1):53-9.
40. Schurgers LJ, Joosen IA, Laufer EM, Chatrou ML, Herfs M, Winkens MH, et al. Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype. *PLoS One* 2012;7(8):e43229.
41. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffers PM, DeMey JG, and Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* 2007;109(7):2823-31.

42. Sierksma AS, van den Hove DL, Pfau F, Philippens M, Bruno O, Fedele E, et al. Improvement of spatial memory function in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D. *Neuropharmacology* 2014;77:120-30.
43. Blane DN, and Lewandowska M. Living with cancer and multimorbidity: the role of primary care. *Curr Opin Support Palliat Care* 2019;13(3):213-9.
44. Cavers D, Habets L, Cunningham-Burley S, Watson E, Banks E, and Campbell C. Living with and beyond cancer with comorbid illness: a qualitative systematic review and evidence synthesis. *J Cancer Surviv* 2019;13(1):148-59.
45. Williams GR, Deal AM, Lund JL, Chang Y, Muss HB, Pergolotti M, et al. Patient-Reported Comorbidity and Survival in Older Adults with Cancer. *Oncologist* 2018;23(4):433-9.
46. (UK) NGC. *Multimorbidity: Assessment, Prioritisation and Management of Care for People with Commonly Occurring Multimorbidity* National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2016 Sep.
47. Schneider KM, O'Donnell BE, and Dean D. Prevalence of multiple chronic conditions in the United States' Medicare population. *Health Qual Life Outcomes* 2009;7:82.



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We aim to establish a rat model in which the combination of CVD and cancer and their influence on mental health can be studied, using previously described work (1-8) as a starting ground. Ultimately, the current proposal leads to new models in which promising therapeutic approaches for both diseases can be evaluated. Furthermore, the probes and imaging tools used in this proposal can be used for multiple purposes, which makes them ideal for future animal research or translation to human research for the clinic.

There are three main aims of the project with specific sub-aims.

Aim 1. Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

To achieve this aim, we have defined a set of sub-aims:

1.1. Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. In this aim, as well as the following aims, we intend to start the experiments when rats reach ± 11 weeks (adults). Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet (project proposal Figure 2) for ± 12 weeks that will raise plasma cholesterol levels. Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels (Figure 1).

1.2. Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to a chow diet with or without warfarin/vitamin K₁ for ± 12 weeks that will induce vessel calcifications (Figure 1).

1.3. Establish a CVD model in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet with or without warfarin/vitamin K₁ (project proposal Figure 2) for ± 12 weeks that will raise plasma cholesterol levels (only measured in WAG/Rij rats) and will induce vessel calcifications. Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels (Figure 1).

Within all sub-aims, the contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals will be measured during the last ± 3 weeks prior to imaging. Controls animals will also be measured from the different aims to compare the outcome data and will be measured simultaneously with the experimental animals (**Figure 2,3,4; project proposal**). We have selected several tests that will be performed, including: i) the Y-maze continuous alternation test (cognitive performance) ii) the object recognition test (cognitive performance) iii) the zero-maze test (anxiety-related behavior) iv) the sucrose preference test (anhedonia; a measure of depressive-like behavior) and v) the open field test. After these tests, imaging will be performed using specific PET/SPECT markers, e.g., ¹⁸F-NaF to visualize active mineralization, ¹⁸F-FDG to visualize inflammation, ¹⁸F-HX4 to visualize hypoxia, and ^{99m}Tc-AnnexinA5 to visualise apoptosis of the vessel wall. Finally, fluorescent markers will be injected including Annexin A5 (apoptosis), Fetuin-A (calcification), pimonidazole (hypoxia) and CCL5 (inflammation) before sacrifice.

Go/No-go decision aim 1: The group(s) of animals displaying no atherosclerotic plaques and/or calcification will not pass to aim 2 and 3.

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing CVD and cancer

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet with or without warfarin/vitamin K₁ (project proposal Figure 3) for ± 12 weeks that will raise plasma cholesterol levels and will induce vessel calcifications. Tumor growth will be induced by either implantation of a syngeneic rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats; week ~ 16) or injected with RK3E-ras cells (SD Apoe^{tm1sage} rats; week ~ 18) (Figure 2). Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol level measurements. The contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals and imaging procedures will be performed as described for aim 1.

Go/No-go decision aim 2: Only if a multi-morbidity model is accomplished, aim 3 will be performed to investigate the molecular mechanisms.

Aim 3. Study the underlying mechanisms between CVD and cancer

To achieve this aim, we have defined a set of sub-aims:

3.1. Study the underlying mechanisms between atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, we will inject WAG/Rij rats with an AAV8 vector expressing mutant PCSK9. Subsequently, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to Western type diet (project proposal Figure 4) for ±12 weeks that will raise plasma cholesterol levels. Tumor growth will be induced by either implantation of a syngeneic rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats; week ~16) or injected with RK3E-ras cells (SD Apoe^{tm1sage} rats; week ~18) (Figure 3). Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels. The contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals and imaging procedures will be performed as described for aim 1. Combination of these markers will shed light on the molecular mechanisms involved of atherosclerosis and cancer.

3.2 Study the underlying mechanisms between calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoe^{tm1sage} rats

For this aim, WAG/Rij and SD Apoe^{tm1sage} rats will be exposed to chow diet with or without warfarin/vitamin K₁ (project proposal Figure 4) for ±12 weeks that will induce vessel calcifications. Tumor growth will be induced by either implantation of a syngeneic rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats; week ~16) or injected with RK3E-ras cells (SD Apoe^{tm1sage} rats; week ~18) (Figure 3). Blood will be taken every 4 weeks to assess cholesterol levels. The contribution of multi-morbidity to variations in mental health of the animals and imaging procedures will be performed as described for aim 1. Combination of these markers will shed light on the molecular mechanisms involved of calcification and cancer.

Justification of outcome parameters

PET/SPECT/CT imaging

These non-invasive imaging techniques allow to quantify plaque formation, calcification, and tumor microenvironmental characteristics amongst others within one animal, thus minimizing the number of animals as compared to ex-vivo analysis. The following labels can be used in this pilot: ¹⁸F-NaF to visualize active mineralization, ¹⁸F-FDG to visualize inflammation and cancer metabolism, ¹⁸F-HX4 to visualize hypoxia in plaques and tumors, and ^{99m}Tc-AnnexinA5 to visualise apoptosis of the vessel wall. Finally, rats will be injected with fluorescently labelled Annexin A5 (apoptosis), Fetuin-A (calcification), pimonidazole (hypoxia) and CCL5 (inflammation) for intravital 2-photon microscopy confirmation.

Tumor growth

Quantitative in vivo analysis of tumor growth will be performed via caliper measurement as tumors grow subcutaneously in the flank to assess differences in tumor growth between the experimental groups.

Tumor microenvironment, immunological parameters and blood biomarkers

Changes in tumor microenvironment (hypoxia, vasculature etc.) and immunological parameters (immune cell tumor infiltration, memory markers, etc.) will be assessed by non-invasive imaging, immunohistochemical analysis and/or flow cytometry analysis of tumor and secondary lymphoid organs, which will allow us to understand the underlying mechanisms between CVD and cancer (multi-morbidity). In addition, blood will be collected at sacrifice for further in vivo analysis.

General clinical parameters:

Body weight loss, lack of grooming, altered response to stimuli can be a result of reduced food intake due to illness, tumor formation and/or treatment. Increased tissue weight (e.g., liver, spleen) may be associated with inflammation.

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

The following procedures will be conducted (the nature, frequency, route, etc. are summarized in Table 1):

1 Tail vein vector injection

Any compound will be administered according to its preferred route. When multiple administration routes are possible, the route resulting in the lowest discomfort will be chosen. For the virus administration, a single tail vein injection will be used.

2 Western type diet (enriched/or not enriched with warfarin (VKA) and vitamin K₁)

Rats will be fed for 12 weeks (high cholesterol diet (\pm VKA/vitamin K₁)).

3 Blood sampling

Blood sampling will be performed via the tail vein according the NC3R recommended guidelines.

Rationale: blood analysis will determine cholesterol levels in the blood which will show virus efficacy. Blood is drawn to a maximum of <10% of the circulating blood every 4 weeks.

4 Subcutaneous injection of tumor cells

Tumor cells will be administered via single SC injection.

5 Subcutaneous implantation of tumor tissue fragments

Surgery and subcutaneous inoculation of rhabdomyosarcoma R1 tumor pieces will be performed under isoflurane anesthesia as previously described (9). Pre- and postsurgery analgesia will be applied. Based on our experience tumors reach required imaging volume between 3 and 5 weeks after inoculation.

Rationale: subcutaneous induction of the tumors allows precise and accurate monitoring of the tumor growth, while being a relevant model of human cancer.

6 Compound injection

Any compound will be administered according to its preferred route. When multiple administration routes are possible, the route resulting in the lowest discomfort will be chosen, in this case via single IP (fluorescent imaging probes) or single IV (radiotracer probes) injections (10).

7 PET/SPECT/CT imaging (studying plaque and tumor characteristics)

PET/SPECT/CT imaging will be performed at one time point per probe upon isoflurane anesthesia to obtain imaging information on plaque formation on disease progression and characteristics. Imaging takes approximately 15 minutes and will be done while the animal is under isoflurane anesthesia. Afterwards, animals will be monitored for the recovery from anesthesia.

Rationale: Imaging allows non-invasive longitudinal evaluation of disease progression and its characteristics. In contrast to ex-vivo analysis, this approach provides multiple probes in one animal, reducing the number of animals used.

8 Cognition and affect-related behavioral testing

Y-maze continuous alternation test

Animals will be exposed to a Y-shaped maze during the dark phase for five minutes, with continuous access to all three arms of the maze. Working memory will be determined by assessing novel arm entries.

Object recognition test

Animals will be habituated to a circular arena prior to testing. During testing, the mouse is presented with two similar objects during the first session (T1), and then one of the two objects is replaced by a new object during a second session (T2). The amount of time taken to explore the new object provides an index of recognition memory. Individual session last 4 minutes each. Intervals between trials will vary depending on baseline performance (usually, 1, 2, 4 and 24h).

Sucrose preference test

Animals will be given access to 2 bottles, one containing normal water and one containing 1% sucrose, for 6h. To prevent location bias, bottles will be switched 3h post-challenge. Total sucrose water intake (mL) and sucrose preference (volume [sucrose water]/volume[sucrose + normal water] × 100) will be determined. Anhedonia is defined as a relative lack of preference for the sucrose solution.

Elevated zero maze

During the elevated zero maze test, animals will be allowed to explore a circular arena consisting of two open and two closed arms/compartments for 5 minutes. Anxiety is measured by the relative amount of time spent in the closed arms, while time spent in the open arms is indicative of natural spontaneous exploratory behavior.

Open Field

A simple sensorimotor test used to determine general activity levels, gross locomotor activity, and exploration habits in rodents. For this purpose, animals will be allowed to freely explore to a square arena for 20 minutes.

Rationale: These five, relatively non-invasive tests will allow us to assess the effects of multi-morbidity on mental health and vice versa.

9 2-photon intravital microscopy

2-photon intravital microscopy will be performed at end point with relevant probes upon isoflurane anesthesia to obtain microscopic information on plaque/tumor formation on disease progression and characteristics. Afterwards, animals will be euthanized according to the guidelines (point 10).

Rationale: Imaging allows specific evaluation of disease progression and its characteristics. In contrast to ex-vivo analysis, this approach provides multiple probes in one animal, reducing the number of animals used.

10 Killing of the animals

The animals will be euthanized according to the guidelines 1) in the end of the experiment to obtain relevant organs for the ex-vivo analysis, 2) if humane endpoint is reached.

Rationale: At the end of the experiments blood (vena cava), urine, and/or tumors and/or other tissues (carotids, aortic arch, heart, kidneys, spleen, liver, lungs, sternum, tibia, trachea, and brains) will have to be collected for extensive analysis. It is justified by the necessity to analyze the excised tissues in order to identify the prognostic/predictive biomarkers of tumor response as well as investigate the underlying mechanisms of tumor response.

Estimated is that upon injection, it takes up to 3-5 weeks to have tumor take and a volume to start imaging. Overall, the longest period an animal is in experiment is estimated to be 3 months.

Table 1: Overview of animal procedures, nature, frequency, and duration of each procedure (SC-subcutaneous; IV-intravenously; IP-intraperitoneally)

Animal procedure	Nature (goal)	Route/Frequency	Duration
1. Tail vein injection	Boosting PCSK9 expression	Tail vein, max 1x	max 1 min
2. Western type diet	Increasing plasma cholesterol Inducing atherosclerosis (plaque build-up)	Food pellets/ continuous	± 3 months
3. Blood sampling	Response biomarker (all groups)	Tail vein, max 5x (before virus)	2 min

		injection, during and at sacrifice)	
4. Subcutaneous injection of tumor cells (SD Apoe^{tm1sage} rats)	Establishing tumor	S.C. flank, max 1x	max 1 min
5. Subcutaneous implantation of tumor tissue fragments (Wag/Rij rats)	Establishing tumor	S.C. flank, max 1x	max 5 min
6. Probe injection	Measuring disease progression and characteristics	max 12x I.P.	max 1 min
7. PET/SPECT/CT imaging	Measuring disease progression and characteristics	max 12x I.V.	max 45 min
8. Cognition and effect-related behavioral testing			
Y-maze continuous alteration test	Cognitive assessment	1x	max 10 min
Object recognition test	Cognitive assessment	Maximally 4 inter-trial intervals next to training, dependent on performance	1 week training, 4 min each trial (2 trials/interval)
Sucrose intake test	Anhedonia test	Training, followed by 3 tests (once weekly)	6 hrs/test day
Elevated zero test	Anxiety test	1x	5 min
Open field	Locomotor behavior	1x	20 min
9. 2-photon intravital microscopy	Measuring disease progression and characteristics	1x	±3 hours
10. Killing of the animals	Response biomarker (all groups)	1x	up to 3 min

Two tumor cell types, which are well characterized, relatively easy to operate and to follow-up were selected based on our own data and/or data of collaborators or reported by the others with regard to rat strain, microenvironmental characteristics of the tumors and formation of primary tumors. Metastasis formation has not been observed for these models at a primary tumor volume at moment of imaging. In order to establish a multi-morbidity model and study the underlying mechanisms between CVD and cancer, rhabdomyosarcoma (WAG/Rij rats) and RK3E-ras (SD Apoe^{tm1sage}) cell types are required.

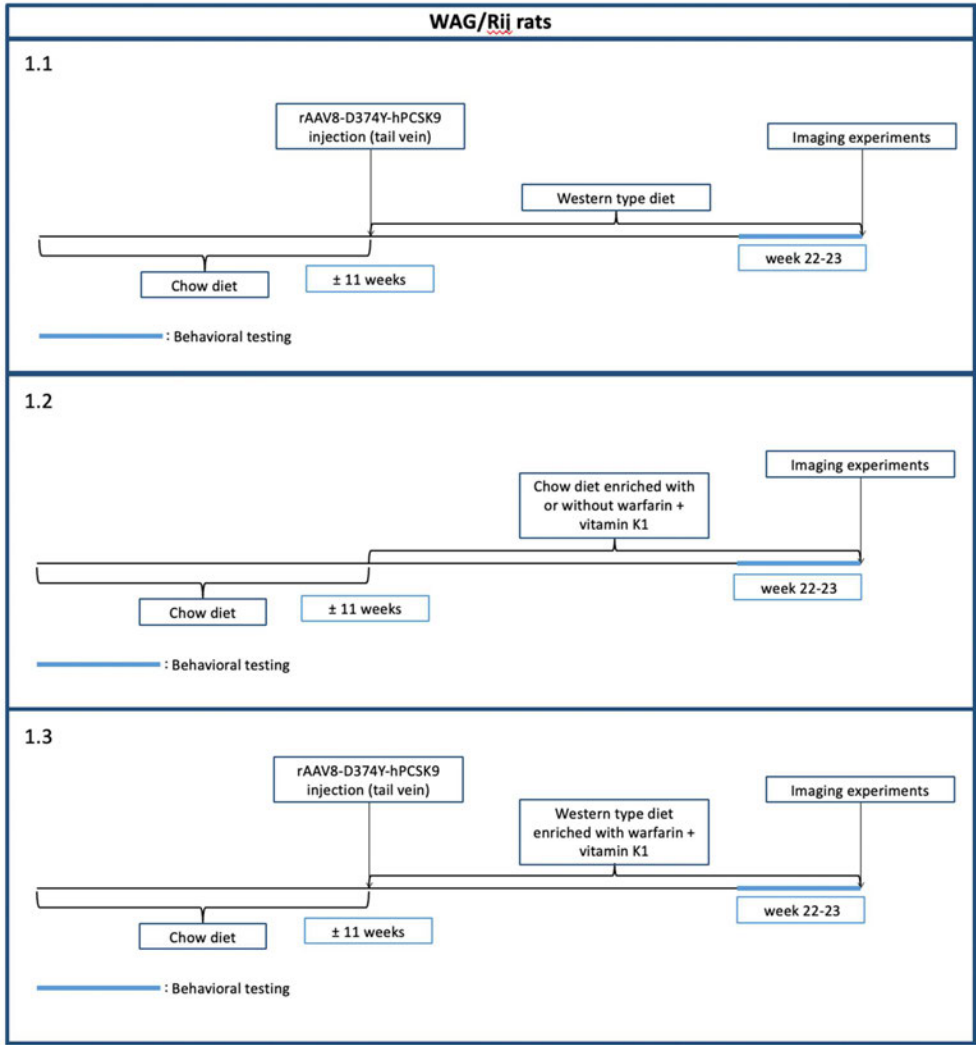


Figure 1: Overview of the timeline with WAG/Rij rats of aim 1. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

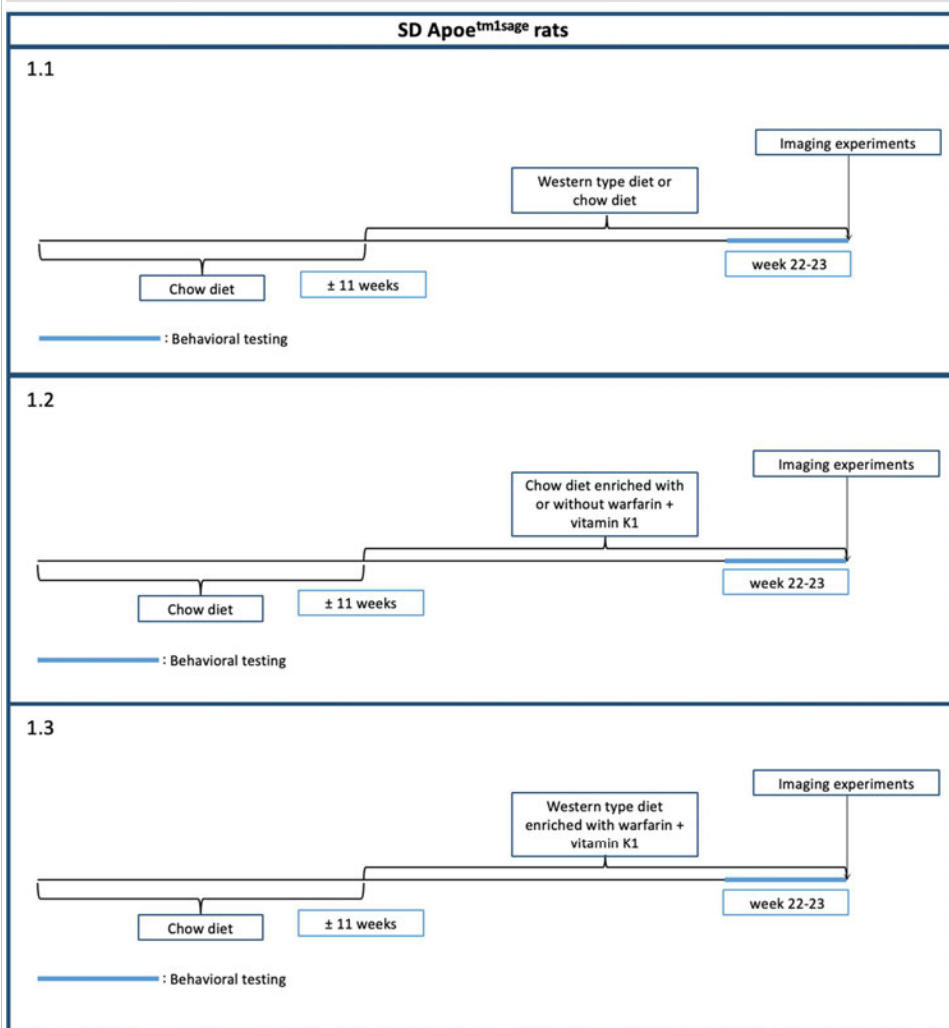


Figure 2: Overview of the timeline with SD Apo^{tm1sage} rats of aim 1. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

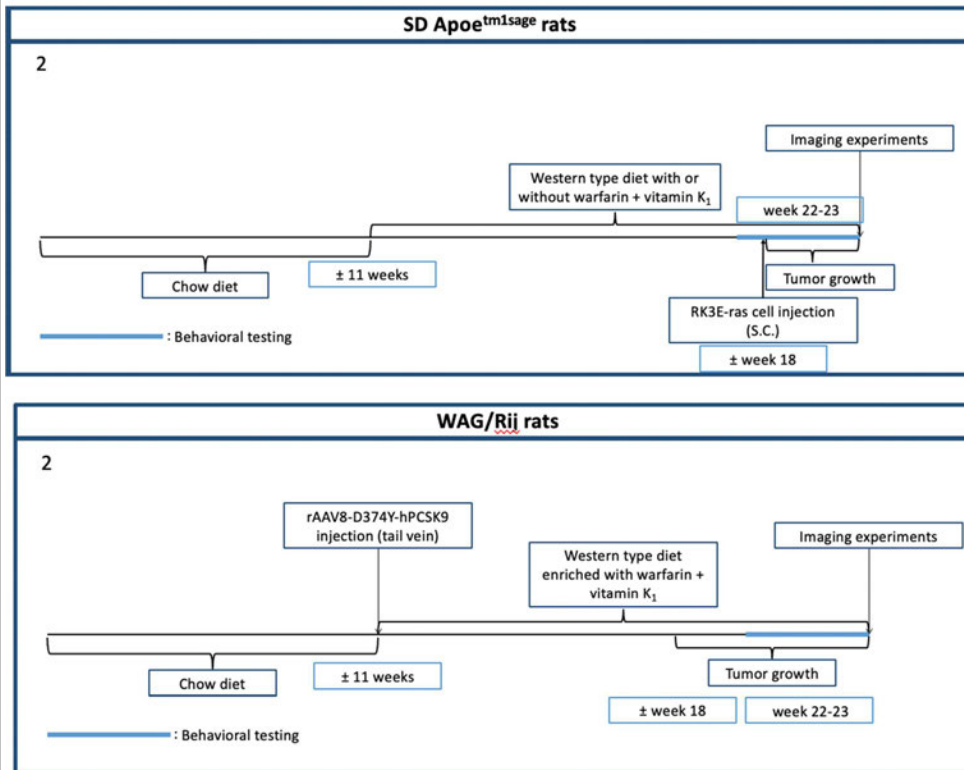


Figure 3: Overview of the timeline of aim 2. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11

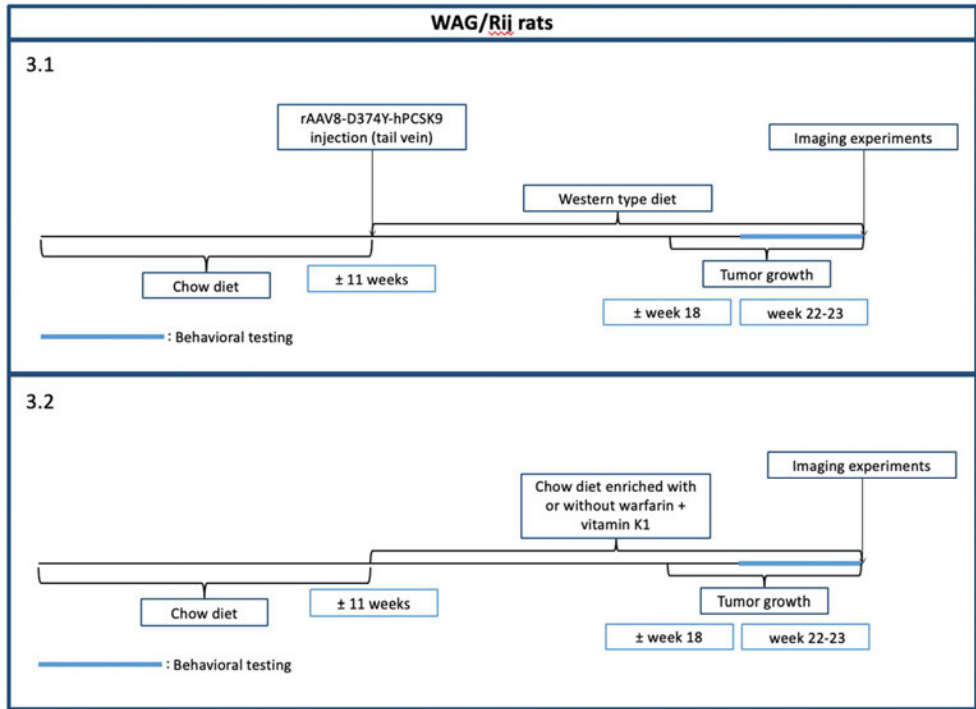


Figure 4: Overview of the timeline with WAG/Rij rats of aim 3. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

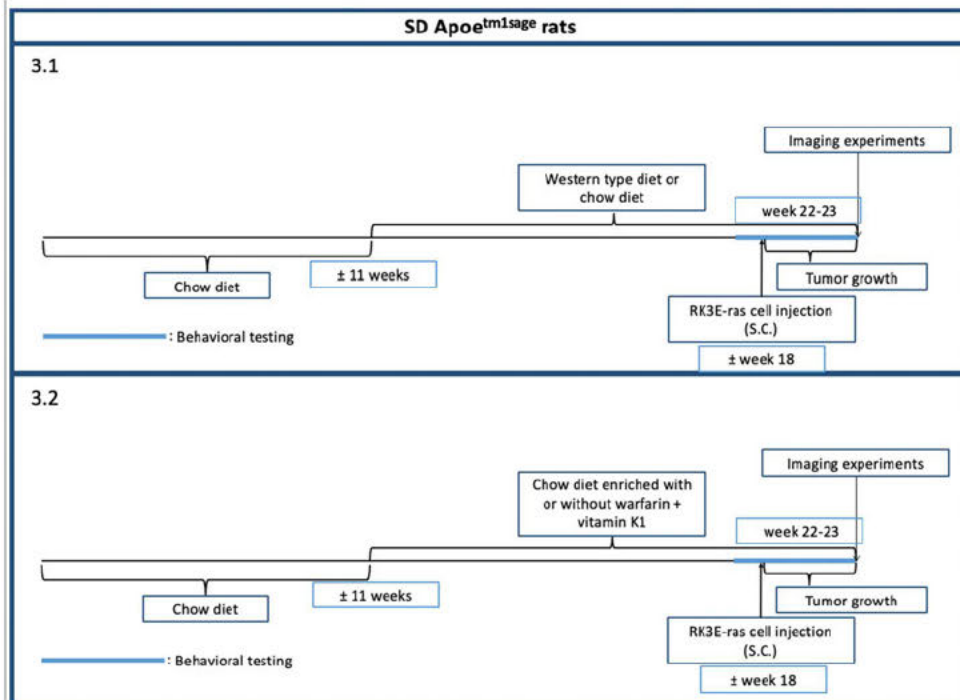


Figure 5: Overview of the timeline with SD Apoε^{tm1sage} rats of aim 3. Animals will be bought from commercial breeders and will be allowed to acclimatize for two weeks before the start of the experiments at +/- week 11.

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

Prior to executing an experiment, we perform statistical analysis (power analysis) to ensure that we use the minimum number of animals per group to detect meaningful differences in outcomes. G*power software is used for sample size calculations. To compare the differences between 2 groups (experimental vs control), we will use a t-test (Means: difference between two independent means, two-tails), A priori: compute required sample size given an $\alpha = 0.05$, power 0.80 and effect size. For each experimental group, we correct this number also for drop-out (10% for all aims, e.g., no tumor formation) and rounded up the final number only at the end. Values for effect size (d/s , where d = difference, s = variance, see page 9) will be based on literature and own experience (9, 11-13).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rat	Licensed breeding facility	adult	200	both	yes	SD Apoε ^{tm1sage}

2	Rat	Licensed breeding facility	adult	240	both	no	Wag/Rij
Provide justifications for these choices							
Species	We will use laboratory rats to achieve our goals. Our previous experience with these rat strains will reduce discomfort for the animals and enhance the accomplishment of a multi-morbidity model.						
Origin	Licenced breeding facilities will be used to obtain laboratory rats.						
Life stages	Adult rats (minimal 11 weeks old) will be used in particular to ensure maturation of the immune system and to reflect clinical situation.						
Number	<p>We have estimated that we will require max 440 rats over entire period of the project. Specifically, for each aim see Table 2.</p> <p>We have calculated the number of animals based on previous experience and published literature by others. The number of animals per group (Aim1,2,3) (based on calculations with the formula above) will be n = 10 animals, taking into account d=30% and s=20%, with a power of 80%. In aim 1.3 and 3.2, we will use 60 rats in total instead of 80 rats, as aim 1.1 and 3.1 already contains the control animals for these aims (Table 2).</p>						
Gender	For all experiments, both male and female animals will be used within this proposal since there is no evidence in literature of difference between sexes (completely new model).						

Genetic alterations	Apoe is a genetic mutation.
Strain	SD Apoe ^{tm1sage} and WAG/Rij rats will be used for this pilot.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

In principle, all animal procedures may cause discomfort and it is expected that only some of them will be associated with acute pain (procedure 1, 2 and 3. All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used following to the GV-SOLAS guidelines (http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Anaest. Analgesie/2021-04_Pain_Management_for_laboratory_animals.pdf).

These include the use of appropriate analgesia and anesthesia procedures whenever necessary. Appropriate pain reduction will be applied upon consultation with the responsible official. Follow-up of the animals will be done regularly, at least daily, to ensure rapid notifications of signs of discomfort. After experimental procedures, the animals will be followed up more frequently. Humane endpoints, as described below, will be strictly followed.

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

- 1) Western type diet has been reported to induce skin irritations (xanthomas) in Apoe^{-/-} and LDLr^{-/-} mice. This may also be the case in rats displaying dyslipidemia.
- 2) Stress due to IV vector injections.
- 3) Stress due to anesthesia for imaging purposes.
- 4) Internal bleedings due to warfarin diet.
- 5) Tumor growth might cause tight skin (during subcutaneous growth).
- 6) Surgery can cause infections, although with very low incidence, at the site of the wound.
- 7) Stress related to behavioral testing will be accompanied with mild discomfort.

Explain why these effects may emerge.

- 1) Xanthomas: age, environmental factors, diet, age at weaning and gender.
- 2) Stress during IV injections can be due to inadequate habituation.
- 3) Stress during insertion of IV catheters can result from incidental animal handling.
- 4) Internal bleedings: previous experience has shown that animals fed a warfarin-enriched diet may develop internal bleedings. The bleedings are likely due to the anticoagulant effects of warfarin.
- 5) During tumor growth normal tissues might not be able to keep up which could e.g. cause tightness of skin during subcutaneous growth.
- 6) Surgery requires the skin to be cut and sutured.
- 7) Stress related to behavioral testing can be due to the aspect of novelty.

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

- 1) Xanthomas: whether xanthomas formation will also be observed in rats in which atherosclerosis is induced by PCSK9 vector injections combined with western type diet remains to be established. However, it should be noted that 1) xanthomas generally developed in elderly rats (in contrast, we will be using relatively young rats) and 2) the reported increase in plasma cholesterol in PCSK9 vector injected mice is relatively mild (in comparison to values observed in LDLR^{-/-} mice). In addition, the rats will be carefully and individually checked for any signs of distress throughout the diet period.
- 2) In order to minimize stress during tail vein injections, the rats will be habituated to the researchers performing the experiments before the start of the protocols.
- 3) In order to minimize stress related to insertion of IV catheters only experienced personnel will be working with the rats.
- 4) In order to minimize the change of internal bleedings due to the anticoagulant effects of warfarin, the food of the rats will be supplemented with vitamin K1 (concentrations to be measured by RP-HPLC). In addition, the rats will be carefully monitored.
- 5) In case of issues due to tumor growth, we will take measures accordingly (e.g., sacrifice the rat when human endpoints are met).
- 6) Surgery will be done aseptically, and antibiotics will be applied whenever necessary.
- 7) In order to minimize stress during behavioral testing, the rats will be habituated to the researchers performing the experiments before the start of the protocols.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

Animals will be monitored at least daily for signs of discomfort. In consultation of the IvD an action table will be defined which includes actions to be taken at specific predefined clinical scores on welfare related criteria and based on which observations HEP's should be applied. Clinical signs of pain, discomfort (general malaise) and stress will be assessed based on clinical signs of awareness, posture, motivation to perform normal species-specific behaviour, social interaction, reaction when handled, facial expression, gait, body condition, bodyweight, coat condition, porphyria, breathing pattern, colour mucosa, faeces, and animal model specific criteria such as tumor development and size, skin lesions.

HEP will be based on:

1. Acute bodyweight loss (> 15 % weight loss in 1-2 days) or progressive bodyweight loss before reaching 20% weight loss. Corrections will be included for tumour growth.
2. Tumor growth interfering with normal behaviour or locomotion.
3. Tumor growth associated with pain, which cannot be alleviated with analgesic treatment.
4. Tumor growth associated alternations in overlying skin structure, e.g., necrosis preceding skin break through
5. Tumor size of more than 15 cm³
6. Anaemia as indicated by symptoms such as pale feet, ears or mucosa, or haematological measures
Coagulation problems after injections resulting in hematoma formation or prolonged bleedings (unstoppable)
7. Failure to eat or drink over a 24h period resulting in dehydration
8. Bloodstained or mucopurulent discharge from any orifice
9. Laboured respiration
10. Nasal discharge and/or cyanosis
11. Diarrhoea (soft faeces) over a 48-h period

Commented [1]: Hier heeft de DEC 15 cm vandaag, maar dit dan veranderen naar 7 cm?

Indicate the likely incidence.

The incidence that one of these parameters, leading to a HEP, will occur is less than 10%. The animals will be well monitored by experienced people and will aim to avoid reaching these humane endpoints. Frequent follow-up of the animals will allow timely interventions to minimize these.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Cumulative exposure and discomfort for the different groups are schematically represented in **Table 2** and **3**. As indicated for each aim, the cumulative discomfort is estimated to be the same for all animals for each specific aim independent of treatment group since control animals will undergo the same procedures (vehicle administration, sham irradiation). Also, the anticipated maximal number of animals per group/discomfort is listed (see section B).

The following procedures have been identified:

Experimental animals:

Establishment of an multimorbidity model						
Group	Aim	purpose	treatment groups	# animals	discomfort	Animal procedures
1	1.1	Establishment of atherosclerosis	WAG/Rij * AAV8 * WTD * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
2	WAG/Rij * saline (control) * WTD * 10 animals * 2 sex		20	moderate	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10	
3	SD-Apoe * WTD * 10 animals * 2 sex		20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10	
4	SD-Apoe * CD (control) * 10 animals * 2 sex		20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10	
5	1.2	Establishment of calcification	WAG/Rij * CDK * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10
6	WAG/Rij * CD (control) * 10 animals * 2 sex		20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10	
7	SD-Apoe * CDK * 10 animals * 2 sex		20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10	
8	SD-Apoe * CD (control) * 10 animals * 2 sex		20	moderate	3, 6, 7, 8, 9, 10	
9	1.3	Establishment of CVD	WAG/Rij * AAV8 * WTDK * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10
10	WAG/Rij * saline (control) * WTDK * 10 animals * 2 sex		20	moderate	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10	
11	SD-Apoe * WTDK * 10 animals * 2 sex		20	moderate	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10	
12						
13	2	Establishment of multimorbidity	WAG/Rij * AAV8 * WTDK * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
14	WAG/Rij * saline (control) * WTDK * RAB * 10 animals * 2 sex		20	moderate	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
15	SD-Apoe * WTDK * RK3E * 10 animals * 2 sex		20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
16	SD-Apoe * WTD * RK3E * 10 animals * 2 sex		20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
17	3.1	Study the underlying mechanisms between atherosclerosis and cancer	WAG/Rij * AAV8 * WTD * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
18	WAG/Rij * saline (control) * WTD * RAB * 10 animals * 2 sex		20	moderate	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
19	SD-Apoe * WTD * RK3E * 10 animals * 2 sex		20	moderate	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
20	SD-Apoe * CD * RK3E * 10 animals * 2 sex		20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
21	3.2	Study the underlying mechanisms between vascular calcification and cancer	WAG/Rij * CDK * RAB * 10 animals * 2 sex	20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
22	WAG/Rij * CD * RAB * 10 animals * 2 sex		20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
23	SD-Apoe * CDK * RK3E * 10 animals * 2 sex		20	moderate	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	
24						
Total # rats				440		

AAV8: injection of AAV8 vector expression PCSK9
WTD: western type diet
WTDK: western type diet with warfarin + vitamin K1
CD: chow diet
CDK: chow diet with warfarin + vitamin K1
RK3E: injection of RK3E-ras cells
RAB: implantation of syngeneic rhabdomyosarcomas

Cumulative the experiment is classified as moderate (100% of all rats).

Animals may also suffer from local transportation (mild) back forward to the imaging facilities.

The mentioned procedures will be used in evaluation of the defined research questions. Animals may be randomly assigned to control or treatment groups and treated as listed in **Table 2**. Anticipated total discomfort scores are based on previous experience and guidelines.

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	Due to the complexity of the pathologies studied (atherosclerosis, cancer and vascular calcification) it is currently not possible to use <i>in vitro</i> alternatives when studying these pathologies separately. The current proposal aims to investigate how these different pathologies influence each other by establishing an animal model for multi-morbidity by combining the above-mentioned pathologies. Hence, we can only use an <i>in vivo</i> approach. The proposed studies including ex vivo validation and uptake of imaging agents in organs such as tumor, vessels, and brain cannot be performed in humans.
-------------	---

Reduction	The design of the experiments and the stepwise procedure being followed between the different objectives, allows us to reduce the number of animals significantly. We have put in place strict go/no-go decisions for efficacy evaluation experiments: when these criteria are not met, further experiments will not be performed (Figure 2 and 3 of the proposal). Furthermore, we aim to combine several outcome parameters (e.g. <i>in vivo</i> imaging followed by <i>ex vivo</i> imaging) in order to use the animals as efficiently as possible to lower animal numbers.
Refinement	We have extensive experience with animal models for atherosclerosis, vascular calcification and cancer, and the required methods, regarding the pathologies that will be studied (atherosclerosis, vascular calcification, and cancer). Our previous practical experience in mice and rats will allow us to reduce discomfort as much as possible. Invasive techniques will be performed by experienced well qualified personnel. Studying cognition and affect will allow for more insight into possible adverse effects for the animals and will allow redesigning future experiments taking into account animal welfare.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

NA

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

After the initial *in vivo* imaging, *ex vivo* imaging techniques will be applied. These techniques cannot be applied in a living animal.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Anaesthetic overdose (if blood via heart puncture will be collected)

The killing of animals will be completed by one of the recommended methods according to the guidelines.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

References:

1. Bjorklund MM, Hollensen AK, Hagensen MK, Dagnaes-Hansen F, Christoffersen C, Mikkelsen JG, et al. Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering. *Circ Res* 2014;114(11):1684-9.
2. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, and Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(24):7734-8.
3. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffers PM, DeMey JG, and Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* 2007;109(7):2823-31.
4. Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Thijssen HH, De Mey JG, and Vermeer C. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. *J Vasc Res* 2003;40(6):531-7.
5. Barendsen GW, and Broerse JJ. Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV x-rays. I. Effects of single exposures. *Eur J Cancer* 1969;5(4):373-91.
6. Dubois L, Landuyt W, Haestermans K, Dupont P, Bormans G, Vermaelen P, et al. Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [(18)F]fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. *Br J Cancer* 2004;91(11):1947-54.
7. Rune I, Rolin B, Lykkesfeldt J, Nielsen DS, Krych L, Kanter JE, et al. Long-term Western diet fed apolipoprotein E-deficient rats exhibit only modest early atherosclerotic characteristics. *Sci Rep* 2018;8(1):5416.
8. Kim SA, Kim HW, Kim DK, Kim SG, Park JC, Kang DW, et al. Rapid induction of malignant tumor in Sprague-Dawley rats by injection of RK3E-ras cells. *Cancer Lett* 2006;235(1):53-9.
9. Shiraishi Y, Xu C, Yang J, Komaki R, and Lin SH. Dosimetric comparison to the heart and cardiac substructure in a large cohort of esophageal cancer patients treated with proton beam therapy or Intensity-modulated radiation therapy. *Radiother Oncol* 2017;125(1):48-54.
10. Dubois LJ, Lieuwes NG, Janssen MH, Peeters WJ, Windhorst AD, Walsh JC, et al. Preclinical evaluation and validation of [18F]HX4, a promising hypoxia marker for PET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(35):14620-5.

11. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(24):5469-79.
12. Kruger T, Oelenberg S, Kaesler N, Schurgers LJ, van de Sandt AM, Boor P, et al. Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(11):2618-24.
13. van Gorp RH, Dijkgraaf I, Broker V, Bauwens M, Leenders P, Jennen D, et al. Off-target effects of oral anticoagulants - vascular effects of vitamin K antagonist and non-vitamin K antagonist oral anticoagulant dabigatran etexilate. *J Thromb Haemost* 2021;19(5):1348-63.

NTS PV2022-003_5.1 lid2e_NTS_lvd

Title

Opzetten van een dieronderzoek dat zich richt op de combinatie van hart- en vaatziekten en kanker, en de invloed daarvan op mentale gezondheid?

Objectives of the project

Mensen lijden vaak aan een combinatie van verschillende ziekten, bijvoorbeeld hart- en vaatziekten en kanker. In dit project kijken we naar de onderliggende mechanismen en de invloed van deze ziekten op mentale gezondheid. Met dat doel zetten we een nieuw dieronderzoek op dat gericht is op het verder uitzoeken hoe deze ziekten aan elkaar gerelateerd zijn. Hiervoor gebruiken we dieren waarin deze 3 ziekten alle drie aanwezig zijn. Het specifieke doel van dit onderzoek is atherosclerose, aderverkalking, kanker en de invloed van deze ziekten op de mentale gezondheid.

Potential benefits

Dit project zal hopelijk leiden tot nieuwe inzichten tussen de bovengenoemde ziekten. Door de huidige vergrijzing zijn er steeds meer patiënten die lijden aan meerdere ziekten die veel bijdragen aan de zorgkosten. Met dit onderzoek kunnen onderliggende relaties bestudeerd worden om zo, op termijn, patiënten beter te kunnen behandelen naar aanleiding van eventuele nieuwe inzichten. Daarnaast maakt dit onderzoek gebruik van nieuwe manieren om resultaten in beeld te brengen, zoals PET en SPECT-scans.

Tijdens dit onderzoek zullen ratten gebruikt worden om één model op te zetten met atherosclerose, vaatverkalking en kanker, waarbij gekeken wordt naar de invloed op de mentale gezondheid. Dit model zal in de toekomst verder gebruikt kunnen worden voor onderzoek, bijvoorbeeld naar behandelingen.

Predicted harms

In what procedures will the animals be used?

De dieren zullen een hoog vet dieet krijgen met en zonder warfarine, een bloedverdunner, wat kan leiden tot huidirritaties en bloedingen waaraan het dier zou kunnen sterven. Deze bloedverdunner wordt veelvuldig in de kliniek voorgeschreven aan patiënten met een verhoogde stollingsneiging. Om eventuele bloedingen zo veel mogelijk te beperken krijgen de dieren extra vitamine K1 toegediend, om de bloedstolling te verbeteren. Verder zal het injecteren van de dieren in licht ongemakken resulteren. De verschillende testen (beeldvorming en mentale gezondheidstesten) kunnen zorgen voor stress van de dieren.

Expected impact

- 1) Huidirritaties door een hoog vet dieet
- 2) Stress door injecties
- 3) Stress door narcose voor beeldvorming
- 4) Interne bloedingen door bloedverdunders
- 5) Tumorontwikkeling kan huidirritaties veroorzaken
- 6) Inbrengen van tumorcellen kan infecties veroorzaken aan de kant van de wond, ook al is deze kans heel klein
- 7) Stress door mentale gezondheidstesten

Reasons for planned fate

Dieren worden gedood aan het einde van het experiment, om die verder te analyseren

Three R's

1 Replacement

Een diermodel zal worden opgezet dat atherosclerose, aderverkalking, kanker en de invloed van deze ziekten op mentale gezondheid combineert. Deze ziekten bestaan uit meerdere invalshoeken die overlap hebben met elkaar, zo is er bijvoorbeeld in atherosclerose en kanker bij beide een duidelijke rol van ontstekingscellen. Ook zullen deze ziektebeelden los van elkaar onderzocht worden. Dat is alleen mogelijk in een diermodel waarbij deze ziektebeelden samen en apart in een rat kunnen worden ingebracht. Daarnaast maken we gebruik van nieuwe beeldvorming in dit project, naast de klassieke PET en SPECT-scans, zoals bijvoorbeeld intravitale microscopie, die hopelijk meer inzicht geven in deze ziektebeelden. Deze beeldvorming kan niet worden uitgevoerd in patiënten. Deze punten tezamen genomen maken het niet mogelijk om proefdierlijke alternatieven te bestuderen zoals celkweek of patiënten, vervanging is dus niet mogelijk.

2 Reduction

Met behulp van statistiek is nagegaan dat er niet meer dieren worden gebruikt dan nodig. Daarnaast zijn er specifieke momenten in het project ingevoerd waarop bekeken wordt of er een reden is om te stoppen met bepaalde onderzoeken. Deze momenten kunnen eventueel tijdens het project zorgen voor een verlaging van het aantal dieren mochten de resultaten niks opleveren, zodat er onnodige dieren worden gebruikt voor onderzoek.

3 Refinement

Om ongemak zoveel mogelijk te beperken worden onderzoeken gestopt op bepaalde tijdstippen die van tevoren zijn vastgesteld, bijvoorbeeld wanneer de cholesterolwaarden in het bloed zullen lijden tot vetophopingen in de huid. Om te voorkomen dat bloedverdunners kunnen leiden tot inwendige bloedingen zullen de dieren tegelijkertijd vitamine K supplementen krijgen in het dieet. Om verder ongemak dat kan worden veroorzaakt door het inbrengen van de tumor te voorkomen zullen de dieren gedood worden voordat de tumor te groot wordt.

Explain the choice of species

In dit onderzoek gebruiken we volwassen ratten, zowel mannelijke als vrouwelijke. De rat is voor deze studies de meest geschikte diersoort om twee redenen. De eerste reden is voor het inbrengen van een tumor. Na het inbrengen groeien tumorcellen snel waardoor de tijd beperkt wordt voor de rest van het onderzoek. Doordat een rat, gezien de lichaamsgrootte, wat meer ruimte heeft dan een muis, kan het onderzoek langer doorlopen dan bij een muis. De tweede reden is de nieuwe beeldvorming in dit project. Een rat heeft grotere bloedvaten die beter zichtbaar worden op PET en SPECT-scans dan die van de muis.



Advies aan CCD

B

Datum 27 december 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216259

Instelling:

5.1 lid 2h

Onderzoeker:

5.1 lid 2e

Project:

Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

Aanvraagnummer:

AVD202216259

Betreft:

Nieuwe aanvraag

Categorieën:

Fundamenteel onderzoek



1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	
	<p>Vragen project:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uit correspondentie tussen u en de DEC blijkt dat dit onderzoek ² niet primair is gebaseerd op mogelijke translationele waarde richting de patiënt, maar vooral is gericht op de opzet van een ³ multimodaal model an sich. U geeft aan in deze context de ⁴ geschiktheid van verschillende vormen van kanker te willen onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). ⁵ Uit uw projectaanvraag blijkt echter onvoldoende ⁶ wetenschappelijke onderbouwing is voor de keuze van deze twee specifieke vormen van kanker. Wij vragen u daarom om toe te lichten waarom deze soorten kanker in uw ogen het meest geschikt zijn voor het opzetten van uw model. Omdat de translationele waarde van het model van wezenlijk belang is voor het behalen van de uiteindelijke projectdoelen, en daarmee het belang van het huidige project, vragen wij u tevens om hierbij in te gaan op de translationele aspecten van deze vormen van kanker. - In uw correspondentie met de DEC geeft u aan 'strikte go/no-go criteria' te hanteren tussen aim 2 en 3. Wij kunnen deze criteria echter niet terugvinden in het projectvoorstel van uw aanvraag. Daarom verzoeken wij u deze criteria alsnog toe te voegen in de strategie sectie. <p>Vragen NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Het directe doel van uw project is het verkrijgen van een dier model van co-morbiditeit, om de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van



Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD_1_5.1 lid2e - pdf

Pagina: 1

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 14:38:33 +01'00'

Even in zijn algemeenheid:

5.2 lid1

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:25:19 +01'00'

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:17:32 +01'00'
weg

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:18:13 +01'00'
van?

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:35:05 +01'00'

Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:17:53 +01'00'
geschiktheid

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:35:09 +01'00'

Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:18:34 +01'00'
de

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:35:55 +01'00'

Nummer: 6 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:18:46 +01'00'
van

Status

5.1 lid2h Geaccepteerd 30-12-2022 16:35:58 +01'00'

Nummer: 7 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 14:35:15 +01'00'

Onder strategie staat "Decision strategy aim 2:

(16) For each rat model, when no atherosclerosis, vascular calcification, and tumor growth yield is present, aim 3 will not be investigated for that model".

Is dit niet genoeg dan?

Status

AkkermanS Geaccepteerd 30-12-2022 16:37:29 +01'00'

Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 30-12-2022 16:37:29 +01'00'

ja vind ik wel, denk dat ik die gemist had.

comorbiditeit. Onder 'objectives' ligt de nadruk echter voornamelijk op het uiteindelijke doel, terwijl dit in deze aanvraag niet de hoofddoelstelling is. Kunt u deze sectie daarom meer in lijn brengen met het daadwerkelijke doelen van uw project en hierbij ook kort ingaan op de samengang tussen de beschreven ziektebeelden.



2

- Kunt u ook een toelichting geven over de samenhang tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker en mentale gezondheid en waarom het van belang is om mentale gezondheid in dit nieuw te ontwikkelen ratmodel te onderzoeken?



3

- Kunt u onder 'procedures' ook toelichten hoe u de mentale gezondheid van de ratten zult onderzoeken?

- Kunt u toelichten wat PET en SPECT-scans zijn en waarom de dieren deze ondergaan? En kunt u de uitvoering deze procedures ook kort toelichten onder 'procedures'?

Kunt u toelichten waarom de dieren behandeld zullen worden met Warfarine?

- Kunt u onder 'procedures' ook de intravitale microscopie benoemen en een korte beschrijving geven van deze techniek?

- Onder 'potential benefits' en 'choice of species' benoemt u PET en SPECT-scans als nieuwe technieken. Onder 'vervanging' noemt u deze technieken echter klassiek en haalt u 'intravitale microscopie' aan als nieuwe beeldvormingstechniek. Kunt u deze discrepantie adresseren?

- Kunt u ook de frequentie en duur van de beschreven procedures kort benoemen en de eventuele negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn benoemen?



4


- Onder 'choice of species' benoemt u praktische argumenten om met ratten te werken. Het doel van uw project is echter het opzetten van translationeel diermodel van comorbiditeit tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Wij verzoeken u daarom om hier ook een wetenschappelijke onderbouwing te geven waarom de door u gekozen diersoort het meest geschikt is voor dit doel. Kunt u hierbij ook ingaan op het aspect van mentale gezondheid?



5


- Kunt u de NTS aanleveren in het officiële Excel-format en hierbij ook het totaal aantal dieren en de aantallen per ongerief categorie benoemen?

Pagina: 2

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:20:43 +01'00'

Status


5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:38:03 +01'00'

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 14:00:36 +01'00'

ik weet ook niet of een gemiddelde lezer het verschil kent tussen atherosclerose en vaatverkalking

Status


5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:39:18 +01'00'

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 14:37:11 +01'00'

5.2 lid1

Status


5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:41:49 +01'00'

 Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:23:00 +01'00'

ik zou alle vragen over de procedures onder elkaar zetten.

Status



5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:41:55 +01'00'

 Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:22:28 +01'00'

een

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:42:11 +01'00'

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health				
 2	Ratten (Rattus norvegicus)	SD Apoetm1sa ge, Wag/Rij	440 	1 Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

Ratten (Rattus norvegicus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van een model van co-morbiditeit [teneinde de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen] met de diersoort rat als uitgangspunt. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De 5.1 lid2h acht het niet denkbeeldig dat het uiteindelijke doel niet behaald zal worden. [...]</p> <p>Citaat C8. De 5.1 lid2h is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker, maar sluit niet uit dat één van de gekozen rattenstammen (WAG/Rij ratten) in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling (deze staat bekend om inherente spontane epileptische aanvallen [met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit]). Bovendien blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose (ondermeer</p>
-------------------	---

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 14:39:21 +01'00'
Gebruiken ze nu 2x zoveel dieren omdat ze beide geslachten gebruiken? 5.2 lid1

↩️ Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 30-12-2022 16:47:35 +01'00'

Ik zie het ook niet terug in de bijlage, maar volgens mij wel en volgens mij heeft de DEc dit voldoende geadresseerd:
Vraag 50: Het is niet correct dat per definitie het aantal gebruikte dieren moet verdubbelen als beide geslachten gebruikt worden. Zie bv. de studie Buch et al. (2019) <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01774-0>. Het probleem is hier dat u eerst een generieke n berekent, en deze vervolgens vermenigvuldigt met 2 omdat u mannen en vrouwen wilt gebruiken. Geslacht moet echter al mee genomen worden in de berekening van de n. In een in silico scenario-analyse vond Buch et al. dat bij bij two-factor ANOVA's – met geslacht als een onafhankelijke variable - de N ten hoogste 33% hoger was t.o.v. een standaard one-factor ANOVA met slechts één van beide geslachten in experiment. Concreet kan dit een aanzienlijke reductie van dieren geven. Wat is uw visie hierop?
Buch et al. heeft deze data gebaseerd op analyses van bestaande data, wat inderdaad een reductie van dieren kan geven. Dit projectvoorstel wordt een trial, wat wil zeggen dat we een inschatting maken wat er uit gaat komen. We hebben geen voorafgaande data waarbij we een twee-factor ANOVA, met geslacht als een onafhankelijke variabele, kunnen meten. In dit geval kunnen we niet veel zeggen beide geslachten hetzelfde gaan reageren of anders. Ons projectvoorstel heeft duidelijke go/no-go momenten ingebouwd om te anticiperen op deze verschillen.

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 14:32:37 +01'00'
5.2 lid1

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:47:51 +01'00'

↩️ Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 30-12-2022 16:47:51 +01'00'
DEC heeft hier uitvoerig op doorgevraagd.

doi: 10.1155/2022/9311227, doi: 10.3390/ijms231911154 en doi: 10.1111/jfbc.14349) niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Opgemerkt dient te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immunohistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslissingstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de **5.1 lid2h** uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Citaat C14.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt.

Ethische afweging van de DEC:

1. Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering, het ongerief [voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puncturing van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken en gedragstesten] en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het cumulatief matige ongerief?

2. Onderstaande lijst is een suggestie, meestal zijn er minder belangengroepen:

o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel
o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van onderzoekers/wetenschappelijke instituten, binnen het project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis,

vascular calcification, and cancer influencing mental health] zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na cumulatief matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen [voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puncturing van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholtte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken, gedragstesten en genetische modificatie] en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verkrijgen van een model van co-morbiditeit met de diersoort rat als uitgangspunt alsmede inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit [de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker]. Dit onderzoek kan uiteindelijk mogelijk perspectief bieden op meer effectieve diagnostiek en therapieën van co-morbiditeit van chronische aandoeningen indien mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit inderdaad worden opgehelderd. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van reëel belang acht. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. De meerderheid van de **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het reële voordeel voor onderzoekers/instituten' als bevestigend. De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar meerderheidsmening weegt het reële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van onderzoekers/instituten, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is in meerderheid van mening dat de voorgestelde

experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Opgemerkt dient echter te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immuunhistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslisstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen. Bovendien kan niet worden uitgesloten dat één van de gekozen rattenstammen in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling. Tevens blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de meerderheidsmening van de 5.1 lid2h uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

De 5.1 lid2h is ervan 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 5.1 lid2h is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt. Naar de mening van de 5.1 lid2h is onderzoek naar co-morbiditeit van substantieel belang en is in het verlengde daarvan onderbouwd gebruik van proefdieren daarvoor niet uit te sluiten. Op grond van bovenstaande overwegingen beschouwt de 5.1 lid2h in meerderheid de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" als ethisch gerechtvaardigd indien voorafgegaan door een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslisstrategie teneinde een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen. Derhalve voorziet de 5.1 lid2h in meerderheid het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" van een positief advies met voorwaarde.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij



- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Hieronder volgt een selectie van de meest relevante correspondentie tussen de DEC en de aanvrager (Bijlage I van het DEC advies) over de rationale achter de keuze voor de diermodellen en de beoogde onderzoeksdoelen.

Citaat bijlage I, Vraag 4.

Vraag DEC: In de inleiding worden met name atherosclerose en aderverkalking belicht, de comorbiditeit van deze aandoeningen met mentale gezondheid en kanker wordt onderbouwd, maar er is vrijwel geen aandacht voor de laatste twee ziektebeelden die toch erg belangrijk zijn voor de aanvraag.


Antwoord: In de inleiding worden atherosclerose, vaatverkalking en kanker beter belicht dan mentale gezondheid. Dit onderzoeksvoorstel bestudeert primair de interactie tussen (1) atherosclerose, vaatverkalking en (2) kanker. En dus geen driehoeksverhouding in relatie tot (3) mentale gezondheid. Dat gezegd zijnde, daar bekend is dat ziektebeelden zoals atherosclerose, vaatverkalking en kanker een effect hebben op mentale gezondheid, willen we tevens weten in hoeverre de interactie tussen deze somatische ziektes de mentale gezondheid beïnvloedt. Het gezamenlijke effect van deze somatische ziektes op mentale gezondheid beïnvloedt mogelijk ook weer het beloop van deze verschillende somatische ziektes, net zozeer als deze elkaar onderling beïnvloeden. Waar het huidige PV een eerste aanzet is om de rol van mentale gezondheid in deze context te bestuderen, ligt de nadruk op het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker.

Citaat Bijlage I, Vraag 5.

Vraag DEC: Het argument waarom niet (een deel van de) studies bij de mens kan worden gedaan is niet overtuigend. Zeker de correlatieve effecten op mentaal welbevinden zouden waarschijnlijk best deels bij de mens bestudeerd kunnen worden. De toevoeging van de trefwoorden co-morbidity en mental health leveren in PubMed al ruim 20.000 citaties op. Graag uw opinie of (deel)onderzoek bij de mens een optie is tot reductie van proefdieren?


Antwoord: Voor dit onderzoek wordt een literatuurstudie uitgevoerd, in de vorm van een review, waar ook zeker patiëntenstudies in zullen worden verwerkt. Hoewel deze studies ons waardevolle informatie zullen geven, zal dit weinig moleculaire en biologische informatie geven.


Pagina: 7

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:43:39 +01'00'

dit is wel heel veel leeswerk, ik zou het echt beperken tot een stuk of drie vragen of alleen maar een korte samenvatting van de onderwerpen waar vragen over gesteld zijn.

Status

 5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:52:38 +01'00'

 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 30-12-2022 16:52:38 +01'00'

Dat heb ik geprobeerd

De invloed van atherosclerose, vaatverkalking en kanker op mentale gezondheid is niet een losstaand onderdeel van ons onderzoek. Het hoofddoel is het opzetten van een multimodaal diermodel, zijnde de combinatie van atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Omdat dit een nieuw model is, waarbij uiteindelijk WAG/Rij en/of SD-ApoE ratten worden gebruikt, zijn de effecten op mentale gezondheid, ofwel het welzijn van de dieren niet bekend. De keuze voor WAG/Rij ratten heeft te maken met het type kanker. De implantatie van rhabdomyosarcoma cellen is vrijwel alleen succesvol in deze rattenlijn omdat de cellen syngene zijn, m.a.w. deze kankercellen zijn ontstaan in de WAG/Rij rat. De keuze voor SD-ApoE ratten heeft te maken met de inductie van atherosclerose en vaatverkalking waar deze rattenlijn gevoelig voor is. Dit onderzoek is niet zozeer gebaseerd op de translatie naar de patiënt, maar vooral gericht op de opzet van het multimodale model. Zou je dit deel weglaten, mis je een essentieel deel van dit onderzoek wat het welzijn van de dieren in acht neemt. Daarnaast geeft de zoekterm comorbiditeit en mentale gezondheid een verkeerd beeld. Hierbij worden hoofdzakelijk de artikelen weergegeven die een associatie laten zien tussen ziekte X en mentale gezondheid. In dit onderzoek willen we de invloed van atherosclerose, vaatverkalking en kanker op mentale gezondheid onderzoeken (en op de lange termijn ook of het gezamenlijke effect van deze somatische ziektes op mentale gezondheid mogelijk ook indirect weer het beloop van deze verschillende somatische ziektes beïnvloedt), niet de associatie van de ziekten an sich op mentale gezondheid. Dit is een nieuw concept.

Citaat Bijlage I, Vraag 6.

Vraag DEC: In de inleiding geeft u aan dat het risico op multimorbiditeit toeneemt met de leeftijd. U kiest er echter voor om met jonge ratten te gaan werken. Het is bekend dat ouderen anders reageren op bv. medicatie dan jongeren. Kunt u uitleggen wat de reden is dat u jonge dieren gebruikt en geen oudere dieren?

Antwoord: Multimorbiditeit is een ziekte die voorkomt in alle leeftijdsgroepen, maar komt veelal tot uiting bij oudere mensen (m.b.v. diagnoses). In deze studie worden jongvolwassen dieren gebruikt doordat onze groep daar ervaring mee heeft. Een andere reden om jongvolwassen dieren in deze studie te gebruiken is door het gebruik hoog vet dieet van 10-12 weken, bij oudere dieren zal de beeldvorming aan het einde van het traject lastiger worden. Daarnaast verkleinen we de kans op epilepsie (WAG/Rij ratten) of dementie (ApoE ratten) door jongvolwassen dieren te gebruiken.

Citaat Bijlage I, Vraag 7.

Vraag DEC: U spreekt in heel brede zin over 'mentale disorders', terwijl u

voor CVD en kanker veel specifieker bent. Kunt u betreffende 'mental disorders' en 'mental health' meer informatie verstrekken en laatstgenoemde definiëren?

Antwoord: Zoals gesteld, vormt dit projectvoorstel een eerste aanzet om de effecten van de interactie tussen hart- en vaatziekten en kanker op (en de mogelijke rol van) mentale gezondheid mee te nemen. De reden dat we mentale ziektes (dat zijn er overigens behoorlijk veel) niet specificeren, is omdat er vrijwel niets bekend is hoe de combinatie van hart- en vaatziekten en kanker de geestelijke gezondheid i.r.t. specifieke ziektebeelden beïnvloedt (en andersom). Dit sluit weer aan bij de insteek om (de interactie tussen) 1) hart- en vaatziekten en 2) kanker centraal te stellen.

Citaat Bijlage I, Vraag 8.

Vraag DEC: Uw benadering van mentale gezondheid is ook erg open. Kunt u nader aangeven wat u verwacht te vinden? Wat zijn mogelijke pathways? Wat zijn uw hypothesen?

Antwoord: Zoals hierboven benoemd bij vraag 4 en vraag 7, staat de benadering van mentale gezondheid open in ons projectvoorstel omdat er vrijwel niets bekend is over hoe de combinatie van harten vaatziekten en kanker de geestelijke gezondheid beïnvloedt (en andersom). Daarbij hebben we als hypothese dat een verminderde cognitieve en affectieve functie een negatief effect hebben op het beloop van zowel hart- en vaatziekten en kanker. Zowel afzonderlijk als in combinatie. Deze twee hypothesen zullen meer centraal staan in mogelijk vervolgonderzoek, waarbij het huidige PV een eerste aanzet betreft.

Citaat Bijlage I, Vraag 10.

Vraag DEC: Een diepgaandere beschrijving van nieuwvormingen zou in uw projectaanvraag niet misstaan, want het enkel bezigen van de term kanker verhult mogelijk het potentieel aan eminente kennis aangaande de biologie van nieuwvormingen binnen uw onderzoeksgroepen. In dit kader verdient het ook een bespiegeling waarom een zeldzame vorm van nieuwvorming als die van dwarsgestreept spierweefsel is verkozen alsmede een wat minder zeldzame vorm van een niertumor mede met het oog op hun translationale waarde?

Antwoord: De modellen zijn gekozen op basis van:

- 1) De expertise
- 2) Syngene model rhabdo/WAG-Rij ratten en ApoE ratten
- 3) Grotere tumoren met patiënt relevante tumor micro-environment

Hierbij staat het model centraal. Het translationele gedeelte ligt in het feit van de comorbiditeit.

Citaat Bijlage I, Vraag 13.

Vraag DEC: De literatuur leert dat in WAG/Rij ratten mogelijk epilepsie en depressie comorbiteiten betreffen (10.1016/j.pnpbp.2010.11.010). Bij het gebruik van een dergelijke lijn is het dus de vraag waar de ratten model voor staan m.b.t. mental disorders. Bovendien vermenigvuldigt het aantal comorbiteiten (u had al atherosclerose, aderverkalking en kanker), wat vragen oproept met betrekking tot validiteit en haalbaarheid van het onderzoek. Kunt u hier een toelichting op geven?

Antwoord: Voor de insteek wat betreft de rol van mentale gezondheid in dit PV, zie de eerdere vragen (o.a. vraag 4 en vraag 7). Verder is het noemenswaardig dat het feit dat deze dieren bijvoorbeeld meer depressie-gerelateerd gedrag vertonen de relevantie van ons onderzoek juist ondersteunt, zowel in relatie tot de interacties tussen ziektebeelden an sich, alsmede in relatie tot mogelijke onderliggende mechanismen. Overigens kan hierbij niet worden gesteld dat WAG/Rij ratten lijden aan een depressie (hetgeen überhaupt niet van knaagdieren kan worden gesteld). We zien alleen een toename in gerelateerde gedragingen t.o.v. wildtype dieren. In ons voorstel zijn voldoende controlegroepen aanwezig om te concluderen waardoor eventuele veranderingen op het cognitieve en affectieve vlak veroorzaakt worden.

Citaat Bijlage I, Vraag 14.


Vraag DEC: Depressief gedrag als co-morbiditeit t.g.v de spontane epilepsie interacteert bovendien met de main read-out mental health. Dit lijkt een opmerkelijke keuze. Graag daarop uw reactie.

Antwoord: Zie ons antwoord op vraag 13. De grotere gevoeligheid voor het vertonen van depressiegerelateerd gedrag is geen argument tegen het gebruik van dit diermodel. Het is eerder een plus. En we nemen dit gedrag mee. Onze hypothese is dat de combinatie van dit model met kanker tot een toename in depressie-gerelateerd gedrag leidt, waar nodig.


Citaat Bijlage I, Vraag 15.

Vraag DEC: U geeft aan dat: "The rat has been chosen as species based on our extensive experience within cancer therapy, imaging, and experiments addressing mental health (37- 39)." Kunt u ook onderbouwen waarom de rat het beste model is voor het beantwoorden

Pagina: 10

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:40:48 +01'00'
enter weghalen

Status
5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:53:03 +01'00'

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:40:56 +01'00'
enter weghalen

Status
5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:53:06 +01'00'

van de vragen die u wilt gaan stellen? De keuze voor de rattenstammen is opmerkelijk (gezien de gevoeligheid voor epileptie). Kunt u meer informatie geven met betrekking tot de keuze voor ApoE¹sage en WAG/Rij rattenlijnen? Ook wordt niet onderbouwd waarom er twee stammen gebruikt worden (duplicatie aantallen)?

Antwoord: De keuze voor ApoE- en WAG/Rij ratten is op basis van de ziektebeelden gekozen. De ApoE¹ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model). Omdat dit de opzet is van een nieuw model, weten we niet op voorhand welk model succesvol gaat zijn in het ontwikkelen van co-morbiditeit, of dat ze beide succesvol zijn, daarom nemen we beide invalshoeken mee. We hebben daarenboven ook een strikte go/nogo beslissingstrategie meegenomen om een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen.

Citaat Bijlage I, Vraag 16.

Vraag DEC: WAG/Rij ratten hebben spontane epileptische aanvallen (met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit) APOE ko ratten zijn al een model voor atherosclerose (AT), alhoewel ook daar blijkbaar discussie over is (Sci Rep . 2018 Apr 3;8(1):5416. doi: 10.1038/s41598-018-23835- z.) en er is een link met Alzheimer. Beide stammen lijken niet per sé bekend te staan om hun tumorgevoeligheid. Wat is dan wel de motivatie voor deze keuze? Kunt u de tumorgevoeligheid van deze stammen onderbouwen met literatuur?

Antwoord: Zie voorgaande vragen. Het feit dat deze dieren meer hersen-gerelateerde problematiek vertonen, toont net de relevante van het bestuderen van het mentale functioneren aan. Dat dit meerdere verschillende problemen betreft heeft grotendeels te maken met een gedeelde etiologie van deze ziektes. De motivatie voor deze ratlijnen is bij vraag 15 uitgelegd, waarbij we de vanuit beide invalshoeken een rattenstam hebben geselecteerd. Een rattenstam die gevoelig is voor atherosclerose/ vaatverkalking (ApoE) en een die gevoelig is voor de ontwikkeling van kanker (WAG/Rij). Op PubMed zijn 230 publicaties te vinden over de WAG/Rij ratlijn en de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model).

Citaat Bijlage I, Vraag 17.

Vraag DEC: Hoe gaat u uw diermodel precies valideren? Hoe beoordeelt u of het een waardevol model is voor het bestuderen van onderliggende mechanismen bij multi-morbide ziekte bij mensen oftewel waarom leidt de combinatie van keuzes tot translationeel valide modellen?

Antwoord: In ons projectvoorstel hebben we beschreven dat we het diermodel valideren met bloedafnames (cholesterolmeting), beeldvorming (PET/SPECT/CT scans en 2-photon intravitaal microscopie) en immunohistochemistry. Voorlopig is dit model onderzoek gericht, waarbij we vooral letten op de ontwikkeling van plaques met verkalking en de vorming van kanker. De translatie naar de mens, zeker met multimodale diermodellen waarbij meerdere ziektes betrokken zijn, moet goed doordacht gebeuren, waarbij we weten waar we over praten. Gezien dit een eerste opzet is, waarbij we nog niet weten hoe het zich zal ontwikkelen, is de eerste stap een goed onderzoeksmodel te creëren waarbij we inzicht krijgen in het onderliggende mechanisme van de betrokken ziekten, waarop in toekomstig onderzoek kan ingewerkt worden, bv op het vlak van behandelingen.

Citaat Bijlage I, Vraag 22.

Vraag DEC: Zou het primaire doel ook eenvoudig weg kunnen zijn 'provide information in the interaction between the diseases atherosclerosis, vascular calcification and cancer'? Dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan lijkt nogal een open deur en aan de andere kant is meten van mentale gezondheid in ratten, als een voorspelling voor menselijke gevoelens, nogal een hachelijke onderneming (hoe hard is dit deel van de wetenschap?).


Antwoord: Het feit dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan is inderdaad een open deur. Hoe dit alles mogelijkwerwijs van invloed is op het beloop van ziekte (en combinaties van ziektes) is dat niet. Zie ook onze antwoorden op onder andere de vragen 4, 5, 7 en 8. Het bestuderen van mentale gezondheid in knaagdieren is inderdaad geen eenvoudige exercitie, doch zeker van bewezen meerwaarde. Angst en cognitie zijn bijvoorbeeld heel goed te meten in knaagdieren.

Citaat Bijlage I, Vraag 28.

Vraag DEC: Bij muizen is het ontstaan van atherosclerose sterk afhankelijk van de genetische achtergrond. Zelfs bij deletie van het apolipoproteïne E gen ontwikkelen CH3 en Balb/c muizen vrijwel geen atherosclerose. Sinds de SD achtergrond blijkbaar compatibel is met atherosclerose in de rat, rijt de vraag of de AAV-PCSK9 niet ook in deze achtergrond kunnen worden uitgevoerd.


Antwoord: Zoals hierboven uitgelegd in vraag 15, 16, 25 en 26, beide

Pagina: 12

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:46:45 +01'00'
enter weghalen

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:57:19 +01'00'

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:46:51 +01'00'
enter weghalen

ratlijnen zijn specifiek geselecteerd vanuit onderzoeksdoeleinden. De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van arteriosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen. De AAV-PCSK9 invalshoek is gekozen omdat WAG/Rij ratten niet vanuit zichzelf gevoelig zijn voor alleen een hoog vet dieet. Daarentegen hebben deze ratten als voordeel dat het vrijwel de enige ratlijn is waarbij implementatie mogelijk is van rhabdomyosarcoma cellen (uitgezonderd naakte ratten). Om tegen arteriosclerose en vaatverkalking te implementeren hebben we gekozen voor AAV-PCSK9.

Citaat Bijlage 1, vraag 41.

Vraag DEC: Waarom zijn deze vijf gedragstesten nu precies nodig?

Antwoord: Zie onze antwoorden op onder andere vragen 4-7. Dit onderzoeksvoorstel betreft een eerste aanzet om de rol van mentale gezondheid in de context van de interactie tussen arteriosclerose, vaatverkalking en kanker te bestuderen. Er is derhalve gekozen voor een algehele (brede screening) op het vlak van cognitie en affect, temeer omdat deze aspecten mogelijk ook weer het beloop van ziekte kan beïnvloeden.

Zie ook Bijlage 2 van het DEC advies, waarin de doelstelling van het project en de keuze voor de diermodellen verder zijn verhelderd tijdens een hoorzitting.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Citaat E1.

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten initieel een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslissingstrategie teneinde een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren.

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.


Citaat E2.

Het uitgebrachte DEC-UM advies is met een meerderheidsstandpunt tot stand gekomen.

Het minderheidsstandpunt werd ingenomen op basis van de volgende twee argumenten:

- Het wordt in het onderhavige onderzoeksvoorstel onvoldoende duidelijk gemaakt of onderzoek bij mensen niet meer voor de hand liggend is (zeker ten aanzien van mentale aspecten) en aldus ook van belang met

Pagina: 13

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:42:20 +01'00'

enter weghalen

Status
5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 16:59:30 +01'00'

	<p>het oog op reductie.</p> <p>- Tevens vindt het betreffende lid de keuze voor de beide soorten nieuwvorming onvoldoende onderbouwd en geeft aan dat wil een model enige relevantie hebben voor uiteindelijke vertaling naar de mens er dan toch tenminste een veelvoorkomende vorm van nieuwvorming (die ook vaak leidt tot mentale effecten) bij mensen moet worden geselecteerd.</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies


Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid.</p> <p>Citaat B4.</p> <p>Ja, twee leden van de DEC-UM zijn tijdens de behandeling van deze aanvraag verschoond geweest daar zij mede-aanvrager zijn.</p>
	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze het minderheidsstandpunt weer en de bijbehorende argumenten. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Het valt ons op dat u veel vragen heeft gesteld, met name aangaande de doelstellingen van het project en de rationale achter de diermodellen. 5.2 lid1</p> <p>Een voorbeeld hiervan is vraag 3 uit bijlage I: "Het wordt nergens expliciet gezegd, maar is de onderzoeksvraag misschien te onderzoeken of er een gezamenlijke grond is (er gelijksoortige werkingsmechanismen zijn) voor de 3 ziektepatronen die verklaren dat ze elkaars voorkomen en verschijnselen versterken? Als dat werkelijk de overkoepelende vraag is waarom wordt die zo niet benoemd?"</p> <p>5.2 lid1 Wij willen u daarom verzoeken om alert te zijn op de hoeveelheid vragen en de formulering hiervan om elke schijn van belangenverstremming te voorkomen. Indien een aanvraag onvoldoende is uitgewerkt en niet toetsbaar is, kunt u ons dit laten weten en adviseren de aanvrager in de gelegenheid te stellen de aanvraag op een aantal specifieke punten te laten herschrijven.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling	Citaat.
Doelstelling	<p>Ultimate goal</p> <p>We aim to establish a multi-modal disease model studying the molecular and biological effects of atherosclerosis, vascular calcification, and cancer. This pilot will provide important information on the interaction between those diseases.</p> <p>Aim 1. Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats</p>





Pagina: 14

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 14:33:59 +01'00'

5.2 lid1

Status

 5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:00:14 +01'00'

 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 30-12-2022 17:00:14 +01'00'

eens, heb em weggehaald

The first aim is very important for the establishment of the multi-model disease model, since we aim to achieve a model containing atherosclerosis, vascular calcification, and tumour growth, which is only achievable when the required level of atherosclerosis and vascular calcification is met (any form of plaque build-up) (40, 41). For this purpose, the disorder levels will be determined via terminal PET/SPECT and 2- photon intravital microscopy experiments with probes for these specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. To achieve this aim, we have defined a set of immediate subaims (a detailed description is provided in section 3.4.):

1.1 Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent atherosclerosis can be established in WAG/Rij and SD Apoetm1sage rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.1, Figure 2).

1.2 Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent calcification can be established in WAG/Rij and SD Apoetm1sage rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.2, Figure 2).

1.3 Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent atherosclerosis and vascular calcification can be induced in one model, establishing a vascular disorder model. This model will be further used in aim 2 (Figure 2).

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing vascular disorders and cancer

When the experimental approach leading to atherosclerosis and vessel calcification has been determined, aim 2 will be conducted to establish tumour growth in addition to atherosclerosis and vascular calcification pathologies (37). These experiments will determine to what extent vascular disorders can be combined with cancer in one model, multi-morbidity model, combining the two most health treating disorders.

Aim 3. Study the underlying mechanisms between vascular disorders and cancer

When the experimental approach leading to a multi-morbidity model has been determined, aim 3 will be conducted to further discover the underlying mechanism connecting these pathologies. To achieve this aim, we have defined a set of immediate sub-aims (a detailed description is

provided in section 3.4.):

3.1 Establish a multi-morbidity model with atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats The established atherosclerosis model of aim 1.1 will be extended by induction of cancer in WAG/Rij and/or SD-Apoetm1sage rats.

3.2 Establish a multi-morbidity model with calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats One or both rat strains from aim 1.2 are selected to determine to what extent calcification and cancer can be established in WAG/Rij and/or SD-Apoetm1sage rats.

Aim 4. Study the influence of atherosclerosis, vascular calcification and/or cancer on mental health

To study if vascular disorders and tumor growth affects the well-being of the animals affect cognition and affect-related behaviors, several non-invasive behavioral tests will be performed. More specifically, for this purpose, during all three aims, before exposing the animals to the various imaging modalities, the cognition- and affect-related behavioral effects of genetic variation (WAG/Rij & SD-Apoetm1sage) and the distinct (phased) interventions (atherosclerosis, vessel calcification and tumorigenesis) will be examined to assess to which extent physical multi-morbidity in the context of this project contributes to variations in mental health of the animals. To control for physical limitations that may impact on performance in the various behavioural test, overall locomotor performance will be studied as well (42). This aim will be implemented over all three aims.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>In the current aging population, more and more patients present with multi-morbidity, i.e., with multiple co-existing chronic diseases. It has been shown that patients that are presented to the clinic with a chronic disease will develop a second chronic condition with a very high likelihood. We want to investigate why there is a great chance of having multiple chronic disorders. It is likely that the chronic diseases with these patients present interact. There are 7 major groups of chronic disease, whereby vascular diseases, cancer, and mental disorders are three of them. However, interactions between atherosclerosis, vascular calcification, mental disorders, and cancer have not been studied in detail even though e.g., cancer patients/survivors often also suffer from cardiovascular disease (8, 43-46). A potential shared mechanism of chronic diseases is senescence or pre-mature ageing of stem cells accounting for multiple diseases.</p> <p>Society as a whole is suffering from increased healthcare costs which are at least partly due to increasing numbers of patients that present with multi-morbidities and chronic disease. Additionally, expenditures per capita increase dramatically in patients with a chronic condition. It is estimated that approximately 83% of all healthcare money is spent on chronic conditions, five times larger compared to patient without chronic disease (47).</p> <p>By sharing our work to other scientists and clinicians, we will contribute to a vital, dynamic and transparent knowledge sharing culture. Moreover, with our research, we aim to establish an animal model for multimorbidity in order to study interactions between pathologies.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat C7. Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met vergelijkbare proefdiermodellen, de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Proc Natl Acad Sci USA, Circ Res, Nutrients, Int J Mol Sci en Nature.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>Due to the complexity of the pathologies studied (atherosclerosis, cancer and vascular calcification) it is currently not possible to use in vitro alternatives when studying these pathologies separately. The current proposal aims to investigate how these different pathologies influence each other by establishing an animal model for multi-morbidity by combining the above-mentioned pathologies. Hence, we can only use an in vivo approach. The proposed studies including ex vivo validation and uptake of imaging agents in organs such as tumor, vessels, and brain cannot be performed in humans.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>The design of the experiments and the stepwise procedure being followed between the different objectives, allows us to reduce the number of animals significantly. We have put in place strict go/no-go decisions for efficacy evaluation experiments: when these criteria are not met, further experiments will not be performed (Figure 2 and 3 of the proposal). Furthermore, we aim to combine several outcome parameters (e.g. in vivo imaging followed by ex vivo imaging) in order to use the animals as efficiently as possible to lower animal numbers.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>We have extensive experience with animal models for atherosclerosis, vascular calcification and cancer, and the required methods, regarding the pathologies that will be studied (atherosclerosis, vascular calcification, and cancer). Our previous practical experience in mice and rats will allow us to reduce discomfort as much as possible. Invasive techniques will be performed by experienced well qualified personnel. Studying cognition and affect will allow for more insight into possible adverse effects for the animals and will allow redesigning future experiments taking into account animal welfare.</p>
Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health	Ja	volgens de richtlijn.


Naam proef		
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health	HEP: <10%	<p>Animals will be monitored at least daily for signs of 1 2 comfort. In consultation of the IvD an action table will be defined which includes actions to be taken at specific predefined clinical scores on welfare related criteria and based on which observations HEP's should be applied. Clinical signs of pain, discomfort (general malaise) and stress will be assessed based on clinical signs of awareness, posture, motivation to perform normal species-specific behaviour, social interaction, reaction when handled, facial expression, gait, body condition, bodyweight, coat condition, porphyria, breathing pattern, colour mucosa, faeces, and animal model specific criteria such as tumor development and size, skin lesions.</p> <p>HEP will be based on:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acute bodyweight loss (> 15 % weight loss in 1-2 days) or progressive bodyweight loss before reaching 20% weight loss. Corrections will be included for tumour growth. 2. Tumor growth interfering with normal behaviour or locomotion. 3. Tumor growth associated with pain, which cannot be alleviated with analgesic treatment. 4. Tumor growth associated alternations in overlying skin structure, e.g., necrosis preceding skin break through 5. Tumor size of more than 15 cm³ 6. Anaemia as indicated by symptoms such as pale feet, ears or mucosa, or haematological measures Coagulation problems after injections resulting in hematoma formation or prolonged bleedings (unstoppable) 7. Failure to eat or drink over a 24h period resulting in dehydration 8. Bloodstained or mucopurulent discharge from any orifice 9. Laboured respiration 10. Nasal discharge and/or cyanosis 11. Diarrhoea (soft faeces) over a 48-h period
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Matig	

Pagina: 20

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:51:10 +01'00'

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:00:47 +01'00'

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:51:13 +01'00'

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:00:52 +01'00'

5 Samenvatting

Het betreft een aanvraag die al meer dan 2 jaar geleden is ingediend bij de IvD, ¹ eerder beoordeeld is door de ^{5.1 lid2h} en vervolgens ingetrokken is door de aanvragers i.v.m. een negatief ^{5.1 lid2h} advies. De aanvragers hebben het PV herschreven en opnieuw ingediend, ^{5.2 lid1}

5.2 lid1

² Het betreft een fundamentele projectaanvraag ³ met als doel het opzetten van een multimodaal ratmodel, het belang van het project hangt echter samen met het uiteindelijke doel (ontwikkelingen van diagnose en behandelingen voor humane patiënten) en de translationele waarde van het nog te ontwikkelen multimodale ratmodel.

Uit correspondentie met de DEC (Bijlage ⁴, vraag 5 en 10) blijkt dat dit onderzoek ⁵ niet zozeer gebaseerd is op de translatie naar de patiënt, maar vooral gericht op de opzet van het multimodale model. De keuze voor SD-ApoE ratten heeft te maken met de inductie van atherosclerose en vaatverkalking waar deze rattenlijn gevoelig voor is, dit is in de ogen van het Secretariaat een logische keuze, gezien de doelstelling van het project. De keuze voor het Syngene model rhabdo/WAG-Rij ratten heeft te maken met het type kanker (de implantatie van rhabdomyosarcoma cellen). Er is geopteerd om een tweetal verschillende vormen van kanker te onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Dit is volgens de DEC echter een zeldzame vorm van nieuwvorming (zie Bijlage 1, vraag 10) en dit is voor een van de DEC-leden reden geweest om een minderheidsstandpunt in te nemen.


5.2 lid1

^{5.2 lid1} in relatie tot de transleerbaarheid van het op te zetten multimodale model. Desondanks zijn het vormen van kanker die, zij het in relatief beperkte frequentie, ook bij de mens voorkomen. Het Secretariaat heeft, ondanks de vragen van de DEC, de aanvrager nogmaals in de gelegenheid gesteld om de modelkeuze en de transleerbaarheid hiervan verder toe te lichten.

De nadruk van deze aanvraag ligt op het opzetten van een multimodaal diermodel voor het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. De aanvrager wil in deze aanvraag echter ook mentale effecten van de ziektebeelden onderzoeken. ^{5.2 lid1}

5.2 lid1


Pagina: 21

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:54:53 +01'00'


De CCD heeft dit dus nog niet eerder gezien?

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:01:43 +01'00'

 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 30-12-2022 17:01:43 +01'00'


daar lijkt het op ja.

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:55:26 +01'00'

hoofdletter

Status


5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:02:02 +01'00'

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:55:16 +01'00'

weg

Status


5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:02:17 +01'00'

 Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 12:56:11 +01'00'

is

Status


5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:04:17 +01'00'

 Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:56:21 +01'00'

weg

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:04:37 +01'00'

 Nummer: 6 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 12:58:05 +01'00'

heeft


Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:04:57 +01'00'

5.2 lid 1

In bijlage 1 worden heldere go/no-go momenten geformuleerd. In de correspondentie met de DEC geeft de aanvrager aan 'strikte go/no-go criteria' te hanteren tussen aim 2 en 3, deze zijn echter niet terug te lezen in het projectvoorstel. De aanvrager is verzocht om de go/no-go criteria tussen aim 2 en 3 te specificeren.

De DEC stelt voor om, in verband met 'minder strikte go/no-go criteria', een voorwaarde aan het project te verbinden, te weten:

"Only the model with effective development atherosclerosis and vascular calcification will be further investigated  in aim 2 and 3."

5.2 lid 1



6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning


5.2 lid 1

4

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.


7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Pagina: 22

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 13:02:05 +01'00'
dubbelop


Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:05:28 +01'00'

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 13:03:04 +01'00'
enter weghalen

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:07:17 +01'00'


 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 13:48:46 +01'00'
er staat in het projectvoorstel wel: Decision strategy aim 2:


(16) For each rat model, when no atherosclerosis, vascular calcification, and tumor growth yield is present, aim 3 will not be investigated for that model

Is dat niet genoeg?

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:07:33 +01'00'

 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 30-12-2022 17:07:38 +01'00'
eens, is voldoende

 Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 13:03:46 +01'00'
hier ben ik het mee eens

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 30-12-2022 17:07:55 +01'00'



Advies aan CCD

B

Datum 30 december 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216259

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health
Aanvraagnummer: AVD202216259
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>Vragen project:</p> <ul style="list-style-type: none">- Uit correspondentie tussen u en de DEC blijkt dat dit onderzoek niet primair is gebaseerd op mogelijke translationele waarde richting de patiënt, maar vooral is gericht op de opzet van een multimodaal model an sich. U geeft aan in deze context de geschiktheid van twee verschillende vormen van kanker te willen onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Uit uw projectaanvraag blijkt echter onvoldoende wat de wetenschappelijke onderbouwing is voor de keuze van deze twee specifieke vormen van kanker. Wij verzoeken u daarom om toe te lichten waarom deze soorten kanker in uw ogen het meest geschikt zijn voor het opzetten van uw model. Omdat de translationele waarde van het model van wezenlijk belang is voor het behalen van de uiteindelijke projectdoelen, en daarmee het belang van het huidige project, vragen wij u tevens om hierbij in te gaan op de translationele aspecten van deze vormen van kanker. <p>Vragen NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- Het directe doel van uw project is het verkrijgen van een dier model van co-morbiditeit, om de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit. Onder 'objectives' ligt de nadruk echter voornamelijk op het uiteindelijke doel, terwijl dit in deze aanvraag niet de hoofddoelstelling is. Kunt u deze sectie daarom meer in lijn brengen met de daadwerkelijke doelen van uw project en hierbij ook kort ingaan op de
---------------	---

samengang tussen de beschreven ziektebeelden.

- Waarschijnlijk is het verschil tussen atherosclerose en vaatverkalking niet bekend bij een groot deel van het algemeen publiek. Kunt u dit verschil daarom toelichten?

- Kunt u ook een toelichting geven over de samenhang tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker en mentale gezondheid en waarom het van belang is om mentale gezondheid in dit nieuw te ontwikkelen ratmodel te onderzoeken?

- Kunt u onder 'procedures' ook toelichten hoe u de mentale gezondheid van de ratten zult onderzoeken?

- Kunt u toelichten wat PET en SPECT-scans zijn en waarom de dieren deze ondergaan? En kunt u de uitvoering deze procedures ook kort toelichten onder 'procedures'?
Kunt u toelichten waarom de dieren behandeld zullen worden met Warfarine?

- Onder 'potential benefits' en 'choice of species' benoemt u PET en SPECT-scans als nieuwe technieken. Onder 'vervanging' noemt u deze technieken echter klassiek en haalt u 'intravitale microscopie' aan als nieuwe beeldvormingstechniek. Kunt u deze discrepantie adresseren?

- Kunt u onder 'procedures' ook de intravitale microscopie benoemen en een korte beschrijving geven van deze techniek?

- Kunt u ook de frequentie en duur van de beschreven procedures kort benoemen en de eventuele negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn benoemen?

- Kunt u de term 'licht ongemakken', onder predicted harms, vervangen door de officiële term, 'licht ongerief'?

- Onder 'choice of species' benoemt u praktische argumenten om met ratten te werken. Het doel van uw project is echter het opzetten van een translationeel diermodel van comorbiditeit tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Wij verzoeken u daarom om hier ook een wetenschappelijke onderbouwing te geven waarom de door u gekozen diersoort het meest geschikt is voor dit doel. Kunt u hierbij ook ingaan op het aspect van mentale gezondheid?

- Kunt u de NTS aanleveren in het officiële Excel-format en hierbij ook

	het totaal aantal dieren en de aantallen per ongerief categorie benoemen?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health				
	Ratten (Rattus norvegicus)	SD Apoetm1sa ge, Wag/Rij	440	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

Ratten (Rattus norvegicus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van een model van co-morbiditeit [teneinde de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen] met de diersoort rat als uitgangspunt. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De 5.1 lid2h acht het niet denkbeeldig dat het uiteindelijke doel niet behaald zal worden. [...]</p> <p>Citaat C8. De 5.1 lid2h is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker, maar sluit niet uit dat één van de gekozen rattenstammen (WAG/Rij ratten) in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling (deze staat</p>
-------------------	--

bekend om inherente spontane epileptische aanvallen [met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit]). Bovendien blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose (ondermeer doi: 10.1155/2022/9311227, doi: 10.3390/ijms231911154 en doi: 10.1111/jfbc.14349) niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Opgemerkt dient te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immuunhistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslisstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de **5.1 lid2h** uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Citaat C14.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt.

Ethische afweging van de DEC:

1. Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering, het ongerief [voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puntering van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken en gedragstesten] en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het cumulatief matige ongerief?

2. Onderstaande lijst is een suggestie, meestal zijn er minder belangengroepen:

- o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel
- o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van onderzoekers/wetenschappelijke instituten, binnen het project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health] zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na cumulatief matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen [voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puncturing van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radio-tracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken, gedragstesten en genetische modificatie] en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verkrijgen van een model van co-morbiditeit met de diersoort rat als uitgangspunt alsmede inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit [de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker]. Dit onderzoek kan uiteindelijk mogelijk perspectief bieden op meer effectieve diagnostiek en therapieën van co-morbiditeit van chronische aandoeningen indien mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit inderdaad worden opgehelderd. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van reëel belang acht. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. De meerderheid van de **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het reële voordeel voor onderzoekers/instituten' als bevestigend. De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar meerderheidsmening weegt het reële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van onderzoekers/instituten, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te

berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is in meerderheid van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Opgemerkt dient echter te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immuunhistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslisstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren. Bovendien kan niet worden uitgesloten dat één van de gekozen rattenstammen in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling. Tevens blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de meerderheidsmening van de **5.1 lid2h** uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

De **5.1 lid2h** is ervan 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 **5.1 lid2h** is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt. Naar de mening van de **5.1 lid2h** is onderzoek naar co-morbiditeit van substantieel belang en is in het verlengde daarvan onderbouwd gebruik van proefdieren daarvoor niet uit te sluiten. Op grond van bovenstaande overwegingen beschouwt de **5.1 lid2h** in meerderheid de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" als ethisch gerechtvaardigd indien voorafgegaan door een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslisstrategie teneinde een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren. Derhalve voorziet de **5.1 lid2h** in meerderheid het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" van een positief advies met voorwaarde.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Hieronder volgt een selectie van de meest relevante correspondentie tussen de DEC en de aanvrager (Bijlage I van het DEC advies) over de rationale achter de keuze voor de diermodellen en de beoogde onderzoeksdoelen.

Zie ook Bijlage 2 van het DEC advies, waarin de doelstelling van het project en de keuze voor de diermodellen verder zijn verhelderd tijdens een hoorzitting.

Citaat Bijlage I, Vraag 6.

Vraag DEC: In de inleiding geeft u aan dat het risico op multimorbiditeit toeneemt met de leeftijd. U kiest er echter voor om met jonge ratten te gaan werken. Het is bekend dat ouderen anders reageren op bv. medicatie dan jongeren. Kunt u uitleggen wat de reden is dat u jonge dieren gebruikt en geen oudere dieren?

Antwoord: Multimorbiditeit is een ziekte die voorkomt in alle leeftijdsgroepen, maar komt veelal tot uiting bij oudere mensen (m.b.v. diagnoses). In deze studie worden jongvolwassen dieren gebruikt doordat onze groep daar ervaring mee heeft. Een andere reden om jongvolwassen dieren in deze studie te gebruiken is door het gebruik hoog vet dieet van 10-12 weken, bij oudere dieren zal de beeldvorming aan het einde van het traject lastiger worden. Daarnaast verkleinen we de kans op epilepsie (WAG/Rij ratten) of dementie (ApoE ratten) door jongvolwassen dieren te gebruiken.

Citaat Bijlage I, Vraag 8.

Vraag DEC: Uw benadering van mentale gezondheid is ook erg open. Kunt u nader aangeven wat u verwacht te vinden? Wat zijn mogelijke pathways? Wat zijn uw hypothesen?

Antwoord: Zoals hierboven benoemd bij vraag 4 en vraag 7, staat de benadering van mentale gezondheid open in ons projectvoorstel omdat er vrijwel niets bekend is over hoe de combinatie van harten vaatziekten en kanker de geestelijke gezondheid beïnvloedt (en andersom). Daarbij hebben we als hypothese dat een verminderde cognitieve en affectieve functie een negatief effect hebben op het beloop van zowel hart- en vaatziekten en kanker. Zowel afzonderlijk als in combinatie. Deze twee

hypothese zullen meer centraal staan in mogelijk vervolgonderzoek, waarbij het huidige PV een eerste aanzet betreft.

Citaat Bijlage I, Vraag 10.

Vraag DEC: Een diepgaandere beschrijving van nieuwvormingen zou in uw projectaanvraag niet misstaan, want het enkel bezigen van de term kanker verhult mogelijk het potentieel aan eminente kennis aangaande de biologie van nieuwvormingen binnen uw onderzoeksgroepen. In dit kader verdient het ook een bespiegeling waarom een zeldzame vorm van nieuwvorming als die van dwarsgestreept spierweefsel is verkozen alsmede een wat minder zeldzame vorm van een niertumor mede met het oog op hun translationale waarde?

Antwoord: De modellen zijn gekozen op basis van:

- 1) De expertise
- 2) Syngene model rhabdo/WAG-Rij ratten en ApoE ratten
- 3) Grotere tumoren met patiënt relevante tumor micro-environment

Hierbij staat het model centraal. Het translationele gedeelte ligt in het feit van de comorbiditeit.

Citaat Bijlage I, Vraag 13.

Vraag DEC: De literatuur leert dat in WAG/Rij ratten mogelijk epilepsie en depressie comorbiditeiten betreffen (10.1016/j.pnpbp.2010.11.010). Bij het gebruik van een dergelijke lijn is het dus de vraag waar de ratten model voor staan m.b.t. mental disorders. Bovendien vermenigvuldigt het aantal comorbiditeiten (u had al atherosclerose, aderverkalking en kanker), wat vragen oproept met betrekking tot validiteit en haalbaarheid van het onderzoek. Kunt u hier een toelichting op geven?

Antwoord: Voor de insteek wat betreft de rol van mentale gezondheid in dit PV, zie de eerdere vragen (o.a. vraag 4 en vraag 7). Verder is het noemenswaardig dat het feit dat deze dieren bijvoorbeeld meer depressie-gerelateerd gedrag vertonen de relevantie van ons onderzoek juist ondersteunt, zowel in relatie tot de interacties tussen ziektebeelden aan sich, alsmede in relatie tot mogelijke onderliggende mechanismen. Overigens kan hierbij niet worden gesteld dat WAG/Rij ratten lijden aan een depressie (hetgeen überhaupt niet van knaagdieren kan worden gesteld). We zien alleen een toename in gerelateerde gedragingen t.o.v. wildtype dieren. In ons voorstel zijn voldoende controlegroepen aanwezig om te concluderen waardoor eventuele veranderingen op het cognitieve en affectieve vlak veroorzaakt worden.

Citaat Bijlage I, Vraag 15.

Vraag DEC: U geeft aan dat: "The rat has been chosen as species based on our extensive experience within cancer therapy, imaging, and experiments addressing mental health (37- 39)." Kunt u ook onderbouwen waarom de rat het beste model is voor het beantwoorden van de vragen die u wilt gaan stellen? De keuze voor de rattenstammen is opmerkelijk (gezien de gevoeligheid voor epileptie). Kunt u meer informatie geven met betrekking tot de keuze voor ApoEtm1sage en WAG/Rij rattenlijnen? Ook wordt niet onderbouwd waarom er twee stammen gebruikt worden (duplicatie aantallen)?

Antwoord: De keuze voor ApoE- en WAG/Rij ratten is op basis van de ziektebeelden gekozen. De ApoEratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model). Omdat dit de opzet is van een nieuw model, weten we niet op voorhand welk model succesvol gaat zijn in het ontwikkelen van co-morbiditeit, of dat ze beide succesvol zijn, daarom nemen we beide invalshoeken mee. We hebben daarenboven ook een strikte go/nogo beslisstrategie meegenomen om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren.

Citaat Bijlage I, Vraag 16.

Vraag DEC: WAG/Rij ratten hebben spontane epileptische aanvallen (met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit) APOE ko ratten zijn al een model voor atherosclerose (AT), alhoewel ook daar blijkbaar discussie over is (Sci Rep . 2018 Apr 3;8(1):5416. doi: 10.1038/s41598-018-23835- z.) en er is een link met Alzheimer. Beide stammen lijken niet per sé bekend te staan om hun tumorgevoeligheid. Wat is dan wel de motivatie voor deze keuze? Kunt u de tumorgevoeligheid van deze stammen onderbouwen met literatuur?

Antwoord: Zie voorgaande vragen. Het feit dat deze dieren meer hersen-gerelateerde problematiek vertonen, toont net de relevante van het bestuderen van het mentale functioneren aan. Dat dit meerdere verschillende problemen betreft heeft grotendeels te maken met een gedeelde etiologie van deze ziektes. De motivatie voor deze ratlijnen is bij vraag 15 uitgelegd, waarbij we de vanuit beide invalshoeken een rattenstam hebben geselecteerd. Een rattenstam die gevoelig is voor atherosclerose/vaatverkalking (ApoE) en een die gevoelig is voor de ontwikkeling van kanker (WAG/Rij). Op PubMed zijn 230 publicaties te vinden over de WAG/Rij ratlijn en de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model).

Citaat Bijlage I, Vraag 22.

Vraag DEC: Zou het primaire doel ook eenvoudig weg kunnen zijn 'provide information in the interaction between the diseases atherosclerosis, vascular calcification and cancer'? Dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan lijkt nogal een open deur en aan de andere kant is meten van mentale gezondheid in ratten, als een voorspelling voor menselijke gevoelens, nogal een hachelijke onderneming (hoe hard is dit deel van de wetenschap?).

Antwoord: Het feit dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan is inderdaad een open deur. Hoe dit alles mogelijk is van invloed is op het beloop van ziekte (en combinaties van ziektes) is dat niet. Zie ook onze antwoorden op onder andere de vragen 4, 5, 7 en 8. Het bestuderen van mentale gezondheid in knaagdieren is inderdaad geen eenvoudige exercitie, doch zeker van bewezen meerwaarde. Angst en cognitie zijn bijvoorbeeld heel goed te meten in knaagdieren.

Citaat Bijlage I, Vraag 28.

Vraag DEC: Bij muizen is het ontstaan van atherosclerose sterk afhankelijk van de genetische achtergrond. Zelfs bij deletie van het apolipoproteïne E gen ontwikkelen CH3 en Balb/c muizen vrijwel geen atherosclerose. Sinds de SD achtergrond blijkaar compatibel is met atherosclerose in de rat, rijst de vraag of de AAV-PCSK9 niet ook in deze achtergrond kunnen worden uitgevoerd.

Antwoord: Zoals hierboven uitgelegd in vraag 15, 16, 25 en 26, beide ratlijnen zijn specifiek geselecteerd vanuit onderzoeksdoeleinden. De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen. De AAV-PCSK9 invalshoek is gekozen omdat WAG/Rij ratten niet vanuit zichzelf gevoelig zijn voor alleen een hoog vet dieet. Daarentegen hebben deze ratten als voordeel dat het vrijwel de enige ratlijn is waarbij implementatie mogelijk is van rhabdomyosarcoma cellen (uitgezonderd naakte ratten). Om toch atherosclerose en vaatverkalking te implementeren hebben we gekozen voor AAV-PCSK9.

Citaat Bijlage 1, vraag 41.

Vraag DEC: Waarom zijn deze vijf gedragstesten nu precies nodig?

Antwoord: Zie onze antwoorden op onder andere vragen 4-7. Dit onderzoeksvorstel betreft een eerste aanzet om de rol van mentale

gezondheid in de context van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te bestuderen. Er is derhalve gekozen voor een algehele (brede screening) op het vlak van cognitie en affect, temeer omdat deze aspecten mogelijk ook weer het beloop van ziekte kan beïnvloeden.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Citaat E1.

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten initieel een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslisstrategie teneinde een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren.

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2.

Het uitgebrachte **5.1 lid2h** advies is met een meerderheidsstandpunt tot stand gekomen.

Het minderheidsstandpunt werd ingenomen op basis van de volgende twee argumenten:

- Het wordt in het onderhavige onderzoeksvoorstel onvoldoende duidelijk gemaakt of onderzoek bij mensen niet meer voor de hand liggend is (zeker ten aanzien van mentale aspecten) en aldus ook van belang met het oog op reductie.

- Tevens vindt het betreffende lid de keuze voor de beide soorten nieuwvorming onvoldoende onderbouwd en geeft aan dat wil een model enige relevantie hebben voor uiteindelijke vertaling naar de mens er dan toch tenminste een veelvoorkomende vorm van nieuwvorming (die ook vaak leidt tot mentale effecten) bij mensen moet worden geselecteerd.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Citaat B4.</p> <p>5.1 lid2h</p>
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze het minderheidsstandpunt weer en de bijbehorende argumenten. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Het valt ons op dat u veel vragen heeft gesteld, met name aangaande de doelstellingen van het project en de rationale achter de diermodellen. 5.2 lid1</p> <p>Een voorbeeld hiervan is vraag 3 uit bijlage I: "Het wordt nergens expliciet gezegd, maar is de onderzoeksvraag misschien te onderzoeken of er een gezamenlijke grond is (er gelijksoortige werkingsmechanismen zijn) voor de 3 ziektepatronen die verklaren dat ze elkaars voorkomen en verschijnselen versterken? Als dat werkelijk de overkoepelende vraag is waarom wordt die zo niet benoemd?"</p> <p>Wij willen u daarom verzoeken om alert te zijn op de hoeveelheid vragen en de formulering hiervan om elke schijn van belangenverstrengeling te voorkomen. Indien een aanvraag onvoldoende is uitgewerkt en niet toetsbaar is, kunt u ons dit laten weten en adviseren de aanvrager in de gelegenheid te stellen de aanvraag op een aantal specifieke punten te laten herschrijven.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat. Ultimate goal We aim to establish a multi-modal disease model studying the molecular and biological effects of atherosclerosis, vascular calcification, and cancer. This pilot will provide important information on the interaction between those diseases.</p> <p>Aim 1. Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats The first aim is very important for the establishment of the multi-model disease model, since we aim to achieve a model containing atherosclerosis, vascular calcification, and tumour growth, which is only achievable when the required level of atherosclerosis and vascular calcification is met (any form of plaque build-up) (40, 41). For this purpose, the disorder levels will be determined via terminal PET/SPECT and 2- photon intravital microscopy experiments with probes for these</p>
---	---

specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. To achieve this aim, we have defined a set of immediate subaims (a detailed description is provided in section 3.4.):

1.1 Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent atherosclerosis can be established in WAG/Rij and SD Apoetm1sage rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.1, Figure 2).

1.2 Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent calcification can be established in WAG/Rij and SD Apoetm1sage rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.2, Figure 2).

1.3 Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats
These experiments will determine to what extent atherosclerosis and vascular calcification can be induced in one model, establishing a vascular disorder model. This model will be further used in aim 2 (Figure 2).

Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing vascular disorders and cancer

When the experimental approach leading to atherosclerosis and vessel calcification has been determined, aim 2 will be conducted to establish tumour growth in addition to atherosclerosis and vascular calcification pathologies (37). These experiments will determine to what extent vascular disorders can be combined with cancer in one model, multi-morbidity model, combining the two most health treating disorders.

Aim 3. Study the underlying mechanisms between vascular disorders and cancer

When the experimental approach leading to a multi-morbidity model has been determined, aim 3 will be conducted to further discover the underlying mechanism connecting these pathologies. To achieve this aim, we have defined a set of immediate sub-aims (a detailed description is provided in section 3.4.):

3.1 Establish a multi-morbidity model with atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats The established atherosclerosis model of aim 1.1 will be extended by induction of cancer in WAG/Rij and/or SD-Apoetm1sage rats.

3.2 Establish a multi-morbidity model with calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats One or both rat strains from aim 1.2 are selected to determine to what extent calcification and cancer can be established in WAG/Rij and/or SD-Apoetm1sage rats.

Aim 4. Study the influence of atherosclerosis, vascular calcification and/or cancer on mental health

To study if vascular disorders and tumor growth affects the well-being of the animals affect cognition and affect-related behaviors, several non-invasive behavioral tests will be performed. More specifically, for this purpose, during all three aims, before exposing the animals to the various imaging modalities, the cognition- and affect-related behavioral effects of genetic variation (WAG/Rij & SD-Apoetm1sage) and the distinct (phased) interventions (atherosclerosis, vessel calcification and tumorigenesis) will be examined to assess to which extent physical multi-morbidity in the context of this project contributes to variations in mental health of the animals. To control for physical limitations that may impact on performance in the various behavioural test, overall locomotor performance will be studied as well (42). This aim will be implemented over all three aims.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>In the current aging population, more and more patients present with multi-morbidity, i.e., with multiple co-existing chronic diseases. It has been shown that patients that are presented to the clinic with a chronic disease will develop a second chronic condition with a very high likelihood. We want to investigate why there is a great chance of having multiple chronic disorders. It is likely that the chronic diseases with these patients present interact. There are 7 major groups of chronic disease, whereby vascular diseases, cancer, and mental disorders are three of them. However, interactions between atherosclerosis, vascular calcification, mental disorders, and cancer have not been studied in detail even though e.g., cancer patients/survivors often also suffer from cardiovascular disease (8, 43-46). A potential shared mechanism of chronic diseases is senescence or pre-mature ageing of stem cells accounting for multiple diseases.</p> <p>Society as a whole is suffering from increased healthcare costs which are at least partly due to increasing numbers of patients that present with multi-morbidities and chronic disease. Additionally, expenditures per capita increase dramatically in patients with a chronic condition. It is estimated that approximately 83% of all healthcare money is spent on chronic conditions, five times larger compared to patient without chronic disease (47).</p> <p>By sharing our work to other scientists and clinicians, we will contribute to a vital, dynamic and transparent knowledge sharing culture. Moreover, with our research, we aim to establish an animal model for multimorbidity in order to study interactions between pathologies.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat C7. Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met vergelijkbare proefdiermodellen, de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Proc Natl Acad Sci USA, Circ Res, Nutrients, Int J Mol Sci en Nature.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>Due to the complexity of the pathologies studied (atherosclerosis, cancer and vascular calcification) it is currently not possible to use in vitro alternatives when studying these pathologies separately. The current proposal aims to investigate how these different pathologies influence each other by establishing an animal model for multi-morbidity by combining the above-mentioned pathologies. Hence, we can only use an in vivo approach. The proposed studies including ex vivo validation and uptake of imaging agents in organs such as tumor, vessels, and brain cannot be performed in humans.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>The design of the experiments and the stepwise procedure being followed between the different objectives, allows us to reduce the number of animals significantly. We have put in place strict go/no-go decisions for efficacy evaluation experiments: when these criteria are not met, further experiments will not be performed (Figure 2 and 3 of the proposal). Furthermore, we aim to combine several outcome parameters (e.g. in vivo imaging followed by ex vivo imaging) in order to use the animals as efficiently as possible to lower animal numbers.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>We have extensive experience with animal models for atherosclerosis, vascular calcification and cancer, and the required methods, regarding the pathologies that will be studied (atherosclerosis, vascular calcification, and cancer). Our previous practical experience in mice and rats will allow us to reduce discomfort as much as possible. Invasive techniques will be performed by experienced well qualified personnel. Studying cognition and affect will allow for more insight into possible adverse effects for the animals and will allow redesigning future experiments taking into account animal welfare.</p>
Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health	HEP: <10%	<p>Animals will be monitored at least daily for signs of discomfort. In consultation of the IvD an action table will be defined which includes actions to be taken at specific predefined clinical scores on welfare related criteria and based on which observations HEP's should be applied. Clinical signs of pain, discomfort (general malaise) and stress will be assessed based on clinical signs of awareness, posture, motivation to perform normal species-specific behaviour, social interaction, reaction when handled, facial expression, gait, body condition, bodyweight, coat condition, porphyria, breathing pattern, colour mucosa, faeces, and animal model specific criteria such as tumor development and size, skin lesions.</p> <p>HEP will be based on:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acute bodyweight loss (> 15 % weight loss in 1-2 days) or progressive bodyweight loss before reaching 20% weight loss. Corrections will be included for tumour growth. 2. Tumor growth interfering with normal behaviour or locomotion. 3. Tumor growth associated with pain, which cannot be alleviated with analgesic treatment. 4. Tumor growth associated alternations in overlying skin structure, e.g., necrosis preceding skin break through 5. Tumor size of more than 15 cm³ 6. Anaemia as indicated by symptoms such as pale feet, ears or mucosa, or haematological measures Coagulation problems after injections resulting in hematoma formation or prolonged bleedings (unstoppable) 7. Failure to eat or drink over a 24h period resulting in dehydration 8. Bloodstained or mucopurulent discharge from any orifice 9. Laboured respiration 10. Nasal discharge and/or cyanosis 11. Diarrhoea (soft faeces) over a 48-h period
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

Het betreft een aanvraag die al meer dan 2 jaar geleden is ingediend bij de IvD, al eerder beoordeeld is door de [5.1 lid2h](#) en vervolgens ingetrokken is door de aanvragers i.v.m. een negatief [5.1 lid2h](#) advies. De aanvragers hebben het PV herschreven en opnieuw ingediend. [5.2 lid1](#)

Het betreft een fundamentele projectaanvraag met als doel het opzetten van een multimodaal ratmodel, het belang van het project hangt echter samen met het uiteindelijke doel (ontwikkelingen van diagnose en behandelingen voor humane patiënten) en de translationele waarde van het nog te ontwikkelen multimodale ratmodel.

Uit correspondentie met de DEC (Bijlage I, vraag 5 en 10) blijkt dat dit onderzoek niet primair gebaseerd is op de translatie naar de patiënt, maar vooral gericht op de opzet van het multimodale model. De keuze voor SD-ApoE ratten heeft te maken met de inductie van atherosclerose en vaatverkalking waar deze rattenlijn gevoelig voor is, [5.2 lid1](#)

. De keuze voor het Syngene model rhabdo/WAG-Rij ratten heeft te maken met het type kanker (de implantatie van rhabdomyosarcoma cellen). Er is geopteerd om een tweetal verschillende vormen van kanker te onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Dit is volgens de DEC echter een zeldzame vorm van nieuwvorming (zie Bijlage 1, vraag 10) en dit is voor een van de DEC-leden reden geweest om een minderheidsstandpunt in te nemen.

[5.2 lid1](#)

. Desondanks zijn het vormen van kanker die, zij het in relatief beperkte frequentie, ook bij de mens voorkomen. Het Secretariaat heeft, ondanks de vragen van de DEC, de aanvrager nogmaals in de gelegenheid gesteld om de modelkeuze en de transleerbaarheid hiervan verder toe te lichten.

De nadruk van deze aanvraag ligt op het opzetten van een multimodaal diermodel voor het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. De aanvrager wil in deze aanvraag echter ook mentale effecten van de ziektebeelden onderzoeken. [5.2 lid1](#)

5.2 lid1



In bijlage 1 worden heldere go/no-go momenten geformuleerd. In de correspondentie met de DEC geeft de aanvrager aan 'strikte go/no-go criteria' te hanteren tussen aim 2 en 3, deze zijn echter niet terug te lezen in het projectvoorstel. De aanvrager is verzocht om de go/no-go criteria tussen aim 2 en 3 te specificeren.

De DEC stelt voor om, in verband met 'minder strikte go/no-go criteria', een voorwaarde aan het project te verbinden. te weten:
"Only the model with effective development of atherosclerosis and vascular calcification will be further investigated in aim 2 and 3."


5.2 lid1



6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

5.2 lid1



De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 30 december 2022 16:14
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202216259

Geachte dr. 5.1 lid2e

Op 14-07-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216259. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

- Het directe doel van uw project is het verkrijgen van een dier model van co-morbiditeit, om de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit. Onder 'objectives' ligt de nadruk echter voornamelijk op het uiteindelijke doel, terwijl dit in deze aanvraag niet de hoofddoelstelling is. Kunt u deze sectie daarom meer in lijn brengen met de daadwerkelijke doelen van uw project en hierbij ook kort ingaan op de samengang tussen de beschreven ziektebeelden.
- Waarschijnlijk is het verschil tussen atherosclerose en vaatverkalking niet bekend bij een groot deel van het algemeen publiek. Kunt u dit verschil daarom toelichten?
- Kunt u ook een toelichting geven over de samenhang tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker en mentale gezondheid en waarom het van belang is om mentale gezondheid in dit nieuw te ontwikkelen ratmodel te onderzoeken?
- Kunt u onder 'procedures' ook toelichten hoe u de mentale gezondheid van de ratten zult onderzoeken?
- Kunt u toelichten wat PET en SPECT-scans zijn en waarom de dieren deze ondergaan? En kunt u de uitvoering deze procedures ook kort toelichten onder 'procedures'? Kunt u toelichten waarom de dieren behandeld zullen worden met Warfarine?
- Onder 'potential benefits' en 'choice of species' benoemt u PET en SPECT-scans als nieuwe technieken. Onder 'vervanging' noemt u deze technieken echter klassiek en haalt u 'intravitale microscopie' aan als nieuwe beeldvormingstechniek. Kunt u deze discrepantie adresseren?
- Kunt u onder 'procedures' ook de intravitale microscopie benoemen en een korte beschrijving geven van deze techniek?
- Kunt u ook de frequentie en duur van de beschreven procedures kort benoemen en de eventuele negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn benoemen?

- Kunt u de term 'licht ongemakken', onder predicted harms, vervangen door de officiële term, 'licht ongerief'?
- Onder 'choice of species' benoemt u praktische argumenten om met ratten te werken. Het doel van uw project is echter het opzetten van een translationeel diermodel van comorbiditeit tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Wij verzoeken u daarom om hier ook een wetenschappelijke onderbouwing te geven waarom de door u gekozen diersoort het meest geschikt is voor dit doel. Kunt u hierbij ook ingaan op het aspect van mentale gezondheid?
- Kunt u de NTS aanleveren in het officiële Excel-format en hierbij ook het totaal aantal dieren en de aantallen per ongerief categorie benoemen?

Onduidelijkheden

- Uit correspondentie tussen u en de DEC blijkt dat dit onderzoek niet primair is gebaseerd op mogelijke translationele waarde richting de patiënt, maar vooral is gericht op de opzet van een multimodaal model an sich. U geeft aan in deze context de geschiktheid van twee verschillende vormen van kanker te willen onderzoeken, te weten een maligne neoplasmie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasmie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Uit uw projectaanvraag blijkt echter onvoldoende wat de wetenschappelijke onderbouwing is voor de keuze van deze twee specifieke vormen van kanker. Wij verzoeken u daarom om toe te lichten waarom deze soorten kanker in uw ogen het meest geschikt zijn voor het opzetten van uw model. Omdat de translationele waarde van het model van wezenlijk belang is voor het behalen van de uiteindelijke projectdoelen, en daarmee het belang van het huidige project, vragen wij u tevens om hierbij in te gaan op de translationele aspecten van deze vormen van kanker.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om op deze vragen te reageren. Als u echter uiterlijk 4 januari 2023 op deze vragen kunt reageren, kunnen uw antwoorden in de eerstvolgende CCD vergadering van 6 januari 2023 worden ingebracht bij de bespreking van uw aanvraag.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Het directe doel van uw project is het verkrijgen van een diermodel van comorbiditeit, om de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit. Onder 'objectives' ligt de nadruk echter voornamelijk op het uiteindelijke doel, terwijl dit in deze aanvraag niet de hoofddoelstelling is. Kunt u deze sectie daarom meer in lijn brengen met de daadwerkelijke doelen van uw project en hierbij ook kort ingaan op de samengang tussen de beschreven ziektebeelden.

We hebben de uitleg onder "objectives" aangepast en ons doel verduidelijkt voor de lezer.

"Door veroudering van de bevolking lijden mensen vaak aan een combinatie van verschillende ziekten. Hart- en vaatziekten en kanker zijn de meest voorkomende chronische ziekten en hebben de hoogste sterftcijfers wereldwijd. Onder hart- en vaatziekten vallen atherosclerose (ophoping van vet in de bloedvaten waardoor de doorgang wordt vernauwd en bloeddorvoer wordt verhinderd) en vaatverkalking (verkalking in de vaten waardoor de vaten stijver worden en minder goed functioneren) onder doodsoorzaak nummer 1. De onderliggende mechanismen tussen deze ziekten zijn weinig onderzocht, maar van belang voor uiteindelijk betere zorg. Chronische ziekten, zoals atherosclerose en kanker, kunnen ook een effect hebben op mentale gezondheid. Om dit beter in kaart te brengen zetten we een nieuw dieronderzoek op dat zich richt op het opzetten van een model met atherosclerose, aderverkalking, kanker en de invloed van deze ziekten op de mentale gezondheid. Verder zoeken we uit hoe deze ziekten aan elkaar gerelateerd zijn."

Waarschijnlijk is het verschil tussen atherosclerose en vaatverkalking niet bekend bij een groot deel van het algemeen publiek. Kunt u dit verschil daarom toelichten?

Beide terminologieën zijn nu uitlegt voor de lezer.

"atherosclerose (ophoping van vet in de bloedvaten waardoor de doorgang wordt vernauwd en bloeddorvoer wordt verhinderd)"

"vaatverkalking (verkalking in de vaten waardoor de vaten stijver worden en minder goed functioneren)"

Kunt u ook een toelichting geven over de samenhang tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker en mentale gezondheid en waarom het van belang is om mentale gezondheid in dit nieuw te ontwikkelen ratmodel te onderzoeken?

Daar bekend is dat ziektebeelden zoals atherosclerose, vaatverkalking en kanker een effect hebben op mentale gezondheid, willen we tevens onderzoeken in hoeverre de interactie tussen deze somatische ziektes de mentale gezondheid beïnvloedt. Het gezamenlijke effect van deze somatische ziektes op mentale gezondheid beïnvloedt mogelijk ook weer het beloop van deze verschillende somatische ziektes, net zozeer als deze elkaar onderling kunnen beïnvloeden.

Kunt u onder 'procedures' ook toelichten hoe u de mentale gezondheid van de ratten zult onderzoeken?

"In de laatste week van het traject zullen de dieren onderworpen worden aan verschillende mentale gezondheidstesten, zoals: de Y-maze en object herkenningstaak voor cognitieve functie en de elevated zero maze en de sucrose preferentie test voor affectieve functie."

Kunt u toelichten wat PET en SPECT-scans zijn en waarom de dieren deze ondergaan?

"PET en SPECT-scans (beeldvormingsmodaliteiten waarbij gebruik gemaakt wordt van radioactiviteit om de functionele aspecten binnen cardiovasculaire ziekten en kanker in beeld te brengen."

En kunt u de uitvoering deze procedures ook kort toelichten onder 'procedures'?

"Daarna zullen de dieren intravitale microscopie, PET en SPECT-scans ondergaan om atherosclerose en kanker in beeld te brengen wat kan zorgen voor mild ongerief"

Kunt u toelichten waarom de dieren behandeld zullen worden met Warfarine?

"met en zonder warfarine, een bloedverdunner die vitamine K remt en daardoor vaatverkalking stimuleert"

Onder 'potential benefits' en 'choice of species' benoemt u PET en SPECT-scans als nieuwe technieken. Onder 'vervanging' noemt u deze technieken echter klassiek en haalt u 'intravitale microscopie' aan als nieuwe beeldvormingstechniek. Kunt u deze discrepantie adresseren?

Deze discrepantie is aangepast. De intravitale microscopie is een nieuwe techniek die gebruikt wordt voor het beter in kaart brengen van vaten/plaques, door de mogelijkheid van het weergeven van vaten/plaques in hun biologische omgeving van een levend organisme. PET en SPECT-scans zijn al veelvuldig gebruikt in dieronderzoek voor hun waardevolle informatie in bijvoorbeeld tumorgroei en plaques.

Kunt u onder 'procedures' ook de intravitale microscopie benoemen en een korte beschrijving geven van deze techniek?

"intravitale microscopie (een techniek waarbij vaten/plaques in hun biologische omgeving in een levend organisme kunnen worden weergegeven)"

Kunt u ook de frequentie en duur van de beschreven procedures kort benoemen en de eventuele negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn benoemen?

Aangepast in de NTS en hieronder benadrukt waar aangepast:

“De dieren zullen 3 maanden een hoog vet dieet krijgen met en zonder warfarine, een bloedverdunner die vitamine K remt en daardoor vaatverkalking stimuleert, wat kan leiden tot huidirritaties en bloedingen waaraan het dier zou kunnen sterven. Deze bloedverdunner wordt veelvuldig in de kliniek voorgeschreven aan patiënten met een verhoogde stollingsneiging. Om eventuele bloedingen zo veel mogelijk te beperken krijgen de dieren extra vitamine K1 toegediend, om de bloedstolling te verbeteren. Verder zal het injecteren en de groei van de kankercellen in de dieren in licht ongerief resulteren. In de laatste week van het traject zullen de dieren onderworpen worden aan verschillende mentale gezondheidstesten, zoals: de Y-maze en object herkenningstaak voor cognitie en de elevated zero maze en de sucrose preferentie test voor affect. Daarna zullen de dieren intravitale microscopie, PET en SPECT-scans ondergaan om atherosclerose en kanker in beeld te brengen wat kan zorgen voor lichte ongerief.”

Kunt u de term 'licht ongemakken', onder predicted harms, vervangen door de officiële term, 'licht ongerief'?

Deze term hebben we aangepast in de NTS

Onder 'choice of species' benoemt u praktische argumenten om met ratten te werken. Het doel van uw project is echter het opzetten van een translationeel diermodel van comorbiditeit tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Wij verzoeken u daarom om hier ook een wetenschappelijke onderbouwing te geven waarom de door u gekozen diersoort het meest geschikt is voor dit doel. Kunt u hierbij ook ingaan op het aspect van mentale gezondheid?

“Ratten lenen zich ook uitstekend voor het bestuderen van cognitie en affect middels specifieke gedragstaken.”

Kunt u de NTS aanleveren in het officiële Excel-format en hierbij ook het totaal aantal dieren en de aantallen per ongerief categorie benoemen?

Bijgevoegd in de mail als bijlage.

Uit correspondentie tussen u en de DEC blijkt dat dit onderzoek niet primair is gebaseerd op mogelijke translationele waarde richting de patiënt, maar vooral is gericht op de opzet van een multimodaal model an sich. U geeft aan in deze context de geschiktheid van twee verschillende vormen van kanker te willen onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Uit uw projectaanvraag blijkt echter onvoldoende wat de wetenschappelijke onderbouwing is voor de keuze van deze twee specifieke vormen van kanker. Wij

verzoeken u daarom om toe te lichten waarom deze soorten kanker in uw ogen het meest geschikt zijn voor het opzetten van uw model. Omdat de translationele waarde van het model van wezenlijk belang is voor het behalen van de uiteindelijke projectdoelen, en daarmee het belang van het huidige project, vragen wij u tevens om hierbij in te gaan op de translationele aspecten van deze vormen van kanker.

De keuze voor ApoE- en WAG/Rij ratten is op basis van de ziektebeelden gekozen waarvoor deze specifieke stammen gebruikt worden. De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. De WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model). De AAV-PCSK9 invalshoek is gekozen omdat WAG/Rij ratten niet vanuit zichzelf gevoelig zijn voor alleen een hoog vet dieet. Daarentegen hebben deze ratten als voordeel dat het vrijwel de enige ratlijn is waarbij implementatie mogelijk is van rhabdomyosarcoma cellen (uitgezonderd naakte ratten). Om toch atherosclerose en vaatverkalking te implementeren hebben we gekozen voor AAV-PCSK9. Daarbij is de rhabdomyosarcoma, wanneer dit model succesvol blijkt, direct transleerbaar naar de patiënt. Literatuur heeft aangetoond dat de rhabdomyosarcoma tumor gelijkenissen vertoont in de mate van hypoxie, het proces van angiogenesis, vergelijkbare opname van radioactieve markers hiervoor (optimale tijdstip 4 uur na injectie) met nek-hoofd of hals-tumor in de patiënt. Daarnaast zijn fase 1 en fase 2 studies direct transleerbaar voor de rhabdomyosarcoma (zie bijvoorbeeld: Dubois et al, PNAS 2011 – van Loon et al EJNMMI 2010 – Zegers et al, Radiother Oncol 2013 – Zegers et al, EJNMMI 2015 – Yaromina et al, Radiother Oncol 2017 – Even et al, Radiother Oncol 2015). Oftewel, de tumor-microenvironment en patiëntkarakteristieken van een rhabdomyosarcomamodel zijn, wanneer nodig, direct transleerbaar op de patiënt. Omgekeerd is de ApoE-lijn gekend voor het ontwikkelen van atherosclerose en is er een syngene tumor model gezocht voor het ontwikkelen van een co-morbiditeitsmodel. Omdat dit de opzet is van een nieuw model, weten we niet op voorhand welk model succesvol gaat zijn in het ontwikkelen van co-morbiditeit, of dat ze beide succesvol zijn, daarom nemen we beide invalshoeken mee. We hebben daarenboven ook een strikte go/no-go beslisstrategie meegenomen om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren. Gezien er op dit moment nog een grote behoefte is aan het ontrafelen van de mechanismes tussen atherosclerose/ vaatverkalking en kanker, en hun invloed op mentale gezondheid, hebben wij onze focus daarop gelegd voor nu.

“In de ogen van de CCD zijn het nut en de noodzaak van het mentale gezondheidsaspect van uw aanvraag nog onvoldoende navolgbaar. Het verband dat u wilt onderzoeken tussen mentale aandoeningen en kanker, atherosclerose en vaatverkalking wordt onvoldoende duidelijk uit het projectvoorstel. Hierdoor is ook niet helder welke effecten u verwacht te meten, hoe de geselecteerde gedragstesten hierop aansluiten en op welke manier de uitkomstparameters van deze taken hier inzicht in zullen geven. Wij verzoeken u daarom om deze aspecten verder uit te werken. Kunt u hierbij ook verder toelichten wat de ‘inflammatory theory’ precies inhoudt ten aanzien van mentale gezondheid?”

Dit zijn feitelijk verschillende vragen in één. Hieronder vindt u onze antwoorden op de afzonderlijke vragen.

Noodzaak van het mentale gezondheidsaspect.

In de inleiding van ons projectvoorstel worden atherosclerose, vaatverkalking en kanker beter belicht dan mentale gezondheid. Dit onderzoeksvoorstel bestudeert namelijk primair de interactie tussen (1) atherosclerose, vaatverkalking en (2) kanker. En dus niet sprake van een driehoeksverhouding in relatie tot (3) mentale aandoeningen. Dat gezegd zijnde, daar bekend is dat ziektebeelden zoals atherosclerose, vaatverkalking en kanker een effect hebben op mentale gezondheid, willen we tevens onderzoeken in hoeverre de interactie tussen deze somatische ziektes de mentale gezondheid beïnvloedt. Het gezamenlijke effect van deze somatische ziektes op mentale gezondheid beïnvloedt mogelijk ook weer het beloop van deze verschillende somatische ziektes, net zozeer als deze elkaar onderling beïnvloeden. Waar het huidige projectvoorstel *een eerste aanzet* is om de rol van mentale gezondheid in deze context te bestuderen, ligt de nadruk op het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker.

Welke effecten we verwachten te meten, hoe de geselecteerde gedragstesten hierop aansluiten en op welke manier de uitkomstparameters van deze taken hier inzicht in zullen geven.

Zoals hierboven benoemd, staat de benadering van mentale gezondheid open in ons projectvoorstel, omdat er nog vrijwel niets bekend is over hoe de combinatie van hart- en vaatziekten en kanker de geestelijke gezondheid beïnvloedt (en andersom). Daarbij hebben we als hypothese dat een verminderde *cognitieve* en *affectieve* functie een negatief effect hebben op het beloop van zowel hart- en vaatziekten en kanker. Zowel afzonderlijk als in combinatie. Deze twee hypothesen zullen meer centraal staan in mogelijk vervolgonderzoek, waarbij het huidige projectvoorstel een eerste aanzet betreft. Er is derhalve voor het huidige projectvoorstel gekozen voor een algehele (brede) en niet al te

invasieve screening op het vlak van cognitie (denk aan leer/geheugentaken) en affect (denk aan angst en depressie-gerelateerde gedragstaken), temeer omdat deze aspecten mogelijk ook weer het beloop van ziekte kunnen beïnvloeden. De verschillende uitkomstmaten bij deze gedragstaken zijn reeds uitgebreid gevalideerd in het kader van cognitieve en affectieve problematiek en gerelateerde stoornissen. In vervolgonderzoek zouden eventueel nog meer verschillende en meer specifieke taken worden meegenomen, afhankelijk van de uitkomsten van deze eerste bredere screening.

Belang 'inflammatory theory'.

De cruciale rol van ontstekingsprocessen op psychisch functioneren omvat een compleet (en behoorlijk breed) vakgebied, dat van de psychoneuroimmunologie. Denk hierbij aan bijvoorbeeld, doch zeker niet uitsluitend, de cytokine hypothese (of 'inflammatory theory') van depressie (en gerelateerde aandoeningen). Zie bijvoorbeeld PMID: 30218560 (<https://doi.org/10.12740/pp/76863>), maar ook PMID: 29102801 (<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.025>). In het kort stelt deze theorie dat inflammatoire processen een brug vormen bij de link tussen stress en mentale stoornissen. Stress kan hierbij ontstekingen veroorzaken. En andersom. Verschillende klinische en preklinische onderzoeken hebben een sterk verband aangetoond tussen depressieve symptomen en de mate van inflammatie. Tevens is aangetoond dat toediening van ontstekings-inducerende en -remmende middelen bij mensen angst en depressieve symptomen respectievelijk kunnen versterken en verlichten, hetgeen het belang van ontsteking als mediator van stress-gerelateerde ziektebeelden aantoont.

Naam van het project	Opzetten van een dieronderzoek dat zich richt op de combinatie van hart- en vaatziekten en kanker, en de invloed daarvan op mentale gezondheid?
NTS-identificatiecode	NTS-NL-484187 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202216259
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	multimorbiditeit rat beeldvorming chronische ziekten
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Oncologie Fundamenteel onderzoek: Cardiovasculair, bloed- en lymfestelsel Fundamenteel onderzoek: Multisystemisch Fundamenteel onderzoek: Ethologie/diergedrag/dierbiologie

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Door veroudering van de bevolking lijden mensen vaak aan een combinatie van verschillende ziekten. Hart- en vaatziekten en kanker zijn de meest voorkomende chronische ziekten en hebben de hoogste sterftcijfers wereldwijd. Onder hart- en vaatziekten vallen atherosclerose (ophoping van vet in de bloedvaten waardoor de doorgang wordt vernauwd en bloeddooier wordt verhinderd) en vaatverkalking (verkalking in de vaten waardoor de vaten stijver worden en minder goed functioneren) onder doodsoorzaak nummer 1. De onderliggende mechanismen tussen deze ziekten zijn weinig onderzocht, maar van belang voor uiteindelijk betere zorg. Chronische ziekten, zoals atherosclerose en kanker, kunnen ook een effect hebben op mentale gezondheid. Om dit beter in kaart te brengen zetten we een nieuw dieronderzoek op dat zich richt op het opzetten van een model met atherosclerose, aderverkalking, kanker en de invloed van deze ziekten op de mentale gezondheid. Verder zoeken we uit hoe deze ziekten aan elkaar gerelateerd zijn.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Dit project zal hopelijk leiden tot nieuwe inzichten tussen de bovengenoemde ziekten. Door de huidige vergrijzing zijn er steeds meer patiënten die lijden aan meerdere ziekten die veel bijdragen aan de zorgkosten. Met dit onderzoek kunnen onderliggende relaties bestudeerd worden om zo, op termijn, patiënten beter te kunnen behandelen naar aanleiding van eventuele nieuwe inzichten. Daarnaast maakt dit onderzoek gebruik van nieuwe manieren om resultaten in beeld te brengen, zoals intravitale microscopie (een techniek waarbij vaten/plaques in hun biologische omgeving in een levend organisme kunnen worden weergegeven), naast de klassieke PET en SPECT-scans (beeldvormingsmodaliteiten waarbij gebruik gemaakt wordt van radioactiviteit om de functionele aspecten binnen cardiovasculaire ziekten en kanker in beeld te brengen). Tijdens dit onderzoek zullen ratten gebruikt worden om één model op te zetten met atherosclerose, vaatverkalking en kanker, waarbij gekeken wordt naar de invloed op de mentale gezondheid. Dit model zal in de toekomst verder gebruikt kunnen worden voor onderzoek, bijvoorbeeld naar behandelingen.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De dieren zullen 3 maanden een hoog vet dieet krijgen met en zonder warfarine, een bloedverdunner die vitamine K remt en daardoor vaatverkalking stimuleert, wat kan leiden tot huidirritaties en bloedingen waaraan het dier zou kunnen sterven. Deze bloedverdunner wordt veelvuldig in de kliniek voorgeschreven aan patiënten met een verhoogde stollingsneiging. Om eventuele bloedingen zo veel mogelijk te beperken krijgen de dieren extra vitamine K1 toegediend, om de bloedstolling te verbeteren. Verder zal het injecteren en de groei van de kankercellen in de dieren in licht ongerief resulteren. In de laatste week van het traject zullen de dieren onderworpen worden aan verschillende mentale gezondheidstesten, zoals: de Y-maze en object herkenningstaak voor cognitieve functie en de elevated zero maze en de sucrose preferentie test voor affectieve functie. Daarna zullen de dieren intravitale microscopie, PET en SPECT-scans ondergaan om atherosclerose en kanker in beeld te brengen wat kan zorgen voor lichte ongerief.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Huidirritaties door een hoog vet dieet 2) Stress door injecties 3) Stress door narcose voor beeldvorming 4) Interne bloedingen door bloedverduunners 5) Tumorontwikkeling kan huidirritaties veroorzaken 6) Inbrengen van tumorcellen kan infecties veroorzaken aan de kant van de wond, ook al is deze kans heel klein 7) Stress door mentale gezondheidstesten 																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratten (Rattus norvegicus)</td> <td>440</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>440</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Ratten (Rattus norvegicus)	440	0	0	440	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Ratten (Rattus norvegicus)	440	0	0	440	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren worden gedood aan het einde van het experiment, om die verder te analyseren</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

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

Een diermodel zal worden opgezet dat atherosclerose, aderverkalking, kanker en de invloed van deze ziekten op mentale gezondheid combineert. Deze ziekten bestaan uit meerdere invalshoeken die overlap hebben met elkaar, zo is er bijvoorbeeld in atherosclerose en kanker bij beide een duidelijke rol van ontstekingscellen. Ook zullen deze ziektebeelden los van elkaar onderzocht worden. Dat is alleen mogelijk in een diermodel waarbij deze ziektebeelden samen en apart in een rat kunnen worden ingebracht. Daarnaast maken we gebruik van nieuwe beeldvorming in dit project, naast de klassieke PET en SPECT-scans, zoals bijvoorbeeld intravitale microscopie, die hopelijk meer inzicht geven in deze ziektebeelden. Deze beeldvorming kan niet worden uitgevoerd in patiënten. Deze punten tezamen genomen maken het niet mogelijk om proefdiervrije alternatieven te bestuderen zoals celkweek of patiënten, vervanging is dus niet mogelijk.

2. Vermindering

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

Met behulp van statistiek is nagegaan dat er niet meer dieren worden gebruikt dan nodig. Daarnaast zijn er specifieke momenten in het project ingevoerd waarop bekeken wordt of er een reden is om te stoppen met bepaalde onderzoeken. Deze momenten kunnen eventueel tijdens het project zorgen voor een verlaging van het aantal dieren mochten de resultaten niks opleveren, zodat er onnodige dieren worden gebruikt voor onderzoek.

3. Verfijning

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

Om ongemak zoveel mogelijk te beperken worden onderzoeken gestopt op bepaalde tijdstippen die van tevoren zijn vastgesteld, bijvoorbeeld wanneer de cholesterolwaarden in het bloed zullen leiden tot vetophoping in de huid. Om te voorkomen dat bloedverdunners kunnen leiden tot inwendige bloedingen zullen de dieren tegelijkertijd vitamine K supplementen krijgen in het dieet. Om verder ongemak dat kan worden veroorzaakt door het inbrengen van de tumor te voorkomen zullen de dieren gedood worden voordat de tumor te groot wordt.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

In dit onderzoek gebruiken we volwassen ratten, zowel mannelijke als vrouwelijke. De rat is voor deze studies de meest geschikte diersoort om twee redenen. De eerste reden is voor het inbrengen van een tumor. Na het inbrengen groeien tumorcellen snel waardoor de tijd beperkt wordt voor de rest van het onderzoek. Doordat een rat, gezien de lichaamsgrootte, wat meer ruimte heeft dan een muis, kan het onderzoek langer doorlopen dan bij een muis. De tweede reden is de nieuwe beeldvorming in dit project. Een rat heeft grotere bloedvaten die beter zichtbaar worden op

intravitale microscopie, PET en SPECT-scans dan die van de muis. Ratten lenen zich ook uitstekend voor het bestuderen van cognitie en affect middels specifieke gedragstaken.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

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

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 27 januari 2023

Betreft Aanvullende adviesnota AVD202216259

Project: Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

Proces

In de CCD vergadering van 6 januari 2023 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). Destijds miste echter nog essentiële informatie voor de beoordeling van de aanvraag. Het Secretariaat heeft de aanvrager hierover vragen gesteld. Deze vragen waren op het moment van de vergadering nog niet door de aanvrager beantwoord.

Het Secretariaat had de aanvrager onderstaande vragen gesteld:

- 1) Uit correspondentie tussen u en de DEC blijkt dat dit onderzoek niet primair is gebaseerd op mogelijke translationele waarde richting de patiënt, maar vooral is gericht op de opzet van een multimodaal model an sich. U geeft aan in deze context de geschiktheid van twee verschillende vormen van kanker te willen onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Uit uw projectaanvraag blijkt echter onvoldoende wat de wetenschappelijke onderbouwing is voor de keuze van deze twee specifieke vormen van kanker. Wij verzoeken u daarom om toe te lichten waarom deze soorten kanker in uw ogen het meest geschikt zijn voor het opzetten van uw model. Omdat de translationele waarde van het model van wezenlijk belang is voor het behalen van de uiteindelijke projectdoelen, en daarmee het belang van het huidige project, vragen wij u tevens om hierbij in te gaan op de translationele aspecten van deze vormen van kanker.
- 2) ¹In de ogen van de CCD zijn het nut en de noodzaak van het mentale gezondheidsaspect van uw aanvraag nog onvoldoende navolgbaar. Het verband dat u wilt onderzoeken tussen mentale aandoeningen en kanker, atherosclerose en vaatverkalking wordt onvoldoende duidelijk uit het projectvoorstel. Hierdoor is ook niet helder welke effecten u verwacht te meten, hoe de geselecteerde gedragstesten hierop aansluiten en op welke manier de uitkomstparameters van deze taken hier inzicht in zullen geven. Wij verzoeken u daarom om deze aspecten verder uit te werken. Kunt u hierbij ook verder toelichten wat de 'inflammatory theory' precies inhoudt ten aanzien van mentale gezondheid?²
- 3) Vragen over de NTS.

Reactie aanvrager

Zie stukken 5.1 lid2h en g.

Vertrouwelijk

Met opmerkingen 5.1(1): Was het niet zo dat deze vraag nog was ingegeven door de commissieleden? Ik zou wel duidelijk maken dat er 2 momenten van vragenstellen waren.

Met opmerkingen 5.1(2): Ik vind in de NTS de tekst onder procedures nog lastig te volgen voor een leek, maar snap het ook als je niet nog een keer vragen over de NTS gaat stellen.

Voorstel Secretariaat

5.2 lid 1

[Redacted text block containing multiple lines of obscured content]

Met opmerkingen [5.2.4(3)]: Ik vind mentale gesteldheid een term die ik aan mensen zou verbinden, niet aan dieren. Ik zou dan eerder "cognitie en gedrag" zeggen ofzo.

Met opmerkingen [5.2.4(4)]: Eens, maar dat was ik eerder ook al



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 27 januari 2023

Betreft Aanvullende adviesnota AVD202216259

Project: Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

Proces

In de CCD vergadering van 6 januari 2023 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). Destijds miste echter nog essentiële informatie voor de beoordeling van de aanvraag. Het Secretariaat had de aanvrager hierover vragen gesteld. Deze vragen waren op het moment van de vergadering nog niet door de aanvrager beantwoord. Ook had de CCD naar aanleiding van de bespreking in de vergadering nog een aanvullende vraag geformuleerd (zie vraag 2). Deze is na de vergadering door het Secretariaat gesteld en de aanvrager heeft de antwoorden op beide vragenrondes gebundeld in zijn reactie.

Het Secretariaat had de aanvrager onderstaande vragen gesteld:

- 1) Uit correspondentie tussen u en de DEC blijkt dat dit onderzoek niet primair is gebaseerd op mogelijke translationele waarde richting de patiënt, maar vooral is gericht op de opzet van een multimodaal model an sich. U geeft aan in deze context de geschiktheid van twee verschillende vormen van kanker te willen onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Uit uw projectaanvraag blijkt echter onvoldoende wat de wetenschappelijke onderbouwing is voor de keuze van deze twee specifieke vormen van kanker. Wij verzoeken u daarom om toe te lichten waarom deze soorten kanker in uw ogen het meest geschikt zijn voor het opzetten van uw model. Omdat de translationele waarde van het model van wezenlijk belang is voor het behalen van de uiteindelijke projectdoelen, en daarmee het belang van het huidige project, vragen wij u tevens om hierbij in te gaan op de translationele aspecten van deze vormen van kanker.
- 2) "In de ogen van de CCD zijn het nut en de noodzaak van het mentale gezondheidsaspect van uw aanvraag nog onvoldoende navolgbaar. Het verband dat u wilt onderzoeken tussen mentale aandoeningen en kanker, atherosclerose en vaatverkalking wordt onvoldoende duidelijk uit het projectvoorstel. Hierdoor is ook niet helder welke effecten u verwacht te meten, hoe de geselecteerde gedragstesten hierop aansluiten en op welke manier de uitkomstparameters van deze taken hier inzicht in zullen geven. Wij verzoeken u daarom om deze aspecten verder uit te werken. Kunt u hierbij ook verder toelichten wat de 'inflammatory theory' precies inhoudt ten aanzien van mentale gezondheid?"
- 3) Vragen over de NTS.

Reactie aanvrager

Vertrouwelijk

Zie stukken [5.1 lid2h](#) a en g.

Voorstel Secretariaat

[5.2 lid1](#)
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



Advies aan CCD

B

Datum 31 januari 2023
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216259

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health
Aanvraagnummer: AVD202216259
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>Vragen project:</p> <ul style="list-style-type: none">- Uit correspondentie tussen u en de DEC blijkt dat dit onderzoek niet primair is gebaseerd op mogelijke translationele waarde richting de patiënt, maar vooral is gericht op de opzet van een multimodaal model an sich. U geeft aan in deze context de geschiktheid van twee verschillende vormen van kanker te willen onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Uit uw projectaanvraag blijkt echter onvoldoende wat de wetenschappelijke onderbouwing is voor de keuze van deze twee specifieke vormen van kanker. Wij verzoeken u daarom om toe te lichten waarom deze soorten kanker in uw ogen het meest geschikt zijn voor het opzetten van uw model. Omdat de translationele waarde van het model van wezenlijk belang is voor het behalen van de uiteindelijke projectdoelen, en daarmee het belang van het huidige project, vragen wij u tevens om hierbij in te gaan op de translationele aspecten van deze vormen van kanker. <p>Vragen NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- Het directe doel van uw project is het verkrijgen van een dier model van co-morbiditeit, om de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit. Onder 'objectives' ligt de nadruk echter voornamelijk op het uiteindelijke doel, terwijl dit in deze aanvraag niet de hoofddoelstelling is. Kunt u deze sectie daarom meer in lijn brengen met de daadwerkelijke doelen van uw project en hierbij ook kort ingaan op de
---------------	---

samengang tussen de beschreven ziektebeelden.

- Waarschijnlijk is het verschil tussen atherosclerose en vaatverkalking niet bekend bij een groot deel van het algemeen publiek. Kunt u dit verschil daarom toelichten?

- Kunt u ook een toelichting geven over de samenhang tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker en mentale gezondheid en waarom het van belang is om mentale gezondheid in dit nieuw te ontwikkelen ratmodel te onderzoeken?

- Kunt u onder 'procedures' ook toelichten hoe u de mentale gezondheid van de ratten zult onderzoeken?

- Kunt u toelichten wat PET en SPECT-scans zijn en waarom de dieren deze ondergaan? En kunt u de uitvoering deze procedures ook kort toelichten onder 'procedures'?
Kunt u toelichten waarom de dieren behandeld zullen worden met Warfarine?

- Onder 'potential benefits' en 'choice of species' benoemt u PET en SPECT-scans als nieuwe technieken. Onder 'vervanging' noemt u deze technieken echter klassiek en haalt u 'intravitale microscopie' aan als nieuwe beeldvormingstechniek. Kunt u deze discrepantie adresseren?

- Kunt u onder 'procedures' ook de intravitale microscopie benoemen en een korte beschrijving geven van deze techniek?

- Kunt u ook de frequentie en duur van de beschreven procedures kort benoemen en de eventuele negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn benoemen?

- Kunt u de term 'licht ongemakken', onder predicted harms, vervangen door de officiële term, 'licht ongerief'?

- Onder 'choice of species' benoemt u praktische argumenten om met ratten te werken. Het doel van uw project is echter het opzetten van een translationeel diermodel van comorbiditeit tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. Wij verzoeken u daarom om hier ook een wetenschappelijke onderbouwing te geven waarom de door u gekozen diersoort het meest geschikt is voor dit doel. Kunt u hierbij ook ingaan op het aspect van mentale gezondheid?

- Kunt u de NTS aanleveren in het officiële Excel-format en hierbij ook

	het totaal aantal dieren en de aantallen per ongerief categorie benoemen?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health				
	Ratten (Rattus norvegicus)	SD Apoetm1sa ge, Wag/Rij	440	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health

Ratten (Rattus norvegicus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van een model van co-morbiditeit [teneinde de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te kunnen bestuderen] met de diersoort rat als uitgangspunt. Het uiteindelijke doel is inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De 5.1 lid2h acht het niet denkbeeldig dat het uiteindelijke doel niet behaald zal worden. [...]</p> <p>Citaat C8. De 5.1 lid2h is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker, maar sluit niet uit dat één van de gekozen rattenstammen (WAG/Rij ratten) in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling (deze staat</p>
-------------------	--

bekend om inherente spontane epileptische aanvallen [met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit]). Bovendien blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose (ondermeer doi: 10.1155/2022/9311227, doi: 10.3390/ijms231911154 en doi: 10.1111/jfbc.14349) niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Opgemerkt dient te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immuunhistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslisstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de 5.1 lid2h uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Citaat C14.

De 5.1 lid2h is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt.

Ethische afweging van de DEC:

1. Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering, het ongerief [voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puntering van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radiotracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken en gedragstesten] en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het cumulatief matige ongerief?

2. Onderstaande lijst is een suggestie, meestal zijn er minder belangengroepen:

- o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel
- o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van onderzoekers/wetenschappelijke instituten, binnen het project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health] zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na cumulatief matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen [voeding van hoogenergetisch voer al dan niet voorzien van extra vitamine K1 of warfarin, herhaalde puncturing van de staartvene ten behoeve van bloedafname en/of toediening van radio-tracers, onderhuidse toediening van neoplastische cellen/fragmenten, toediening van fluorescente beeldvormingsprobes in de buikholte, herhaalde anesthesie ten behoeve van diverse beeldvormende technieken, gedragstesten en genetische modificatie] en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verkrijgen van een model van co-morbiditeit met de diersoort rat als uitgangspunt alsmede inzicht verwerven in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van co-morbiditeit [de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker]. Dit onderzoek kan uiteindelijk mogelijk perspectief bieden op meer effectieve diagnostiek en therapieën van co-morbiditeit van chronische aandoeningen indien mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van comorbiditeit inderdaad worden opgehelderd. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van reëel belang acht. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. De meerderheid van de **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het onderzoek naar de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker in het voorgestelde project [Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health], de opoffering en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het reële voordeel voor onderzoekers/instituten' als bevestigend. De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar meerderheidsmening weegt het reële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van onderzoekers/instituten, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te

berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is in meerderheid van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Opgemerkt dient echter te worden dat de voorgestelde uitkomstparameters niet nader zijn gekwantificeerd en dat één ervan (immuunhistochemie) enkel postmortaal kan worden toegepast. De combinatie van een minder strikte go/no-go beslisstrategie en een sequentiële onderzoeksopzet maken het aldus hachelijk om een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen. Bovendien kan niet worden uitgesloten dat één van de gekozen rattenstammen in meer of mindere mate zal interveniëren met het behalen van de doelstelling. Tevens blijken reeds bestaande alternatieve rattenstammen voor atherosclerose niet in deze aanvraag beschouwd te zijn. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de meerderheidsmening van de **5.1 lid2h** uiteindelijk leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

De **5.1 lid2h** is ervan 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 **5.1 lid2h** is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel, alhoewel er nog een literatuurstudie wordt uitgevoerd, in de vorm van een review, waarin ook patiëntenstudies zullen worden verwerkt. Naar de mening van de **5.1 lid2h** is onderzoek naar co-morbiditeit van substantieel belang en is in het verlengde daarvan onderbouwd gebruik van proefdieren daarvoor niet uit te sluiten. Op grond van bovenstaande overwegingen beschouwt de **5.1 lid2h** in meerderheid de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" als ethisch gerechtvaardigd indien voorafgegaan door een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslisstrategie teneinde een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen. Derhalve voorziet de **5.1 lid2h** in meerderheid het projectvoorstel "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, and cancer influencing mental health" van een positief advies met voorwaarde.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Hieronder volgt een selectie van de meest relevante correspondentie tussen de DEC en de aanvrager (Bijlage I van het DEC advies) over de rationale achter de keuze voor de diermodellen en de beoogde onderzoeksdoelen.

Zie ook Bijlage 2 van het DEC advies, waarin de doelstelling van het project en de keuze voor de diermodellen verder zijn verhelderd tijdens een hoorzitting.

Citaat Bijlage I, Vraag 6.

Vraag DEC: In de inleiding geeft u aan dat het risico op multimorbiditeit toeneemt met de leeftijd. U kiest er echter voor om met jonge ratten te gaan werken. Het is bekend dat ouderen anders reageren op bv. medicatie dan jongeren. Kunt u uitleggen wat de reden is dat u jonge dieren gebruikt en geen oudere dieren?

Antwoord: Multimorbiditeit is een ziekte die voorkomt in alle leeftijdsgroepen, maar komt veelal tot uiting bij oudere mensen (m.b.v. diagnoses). In deze studie worden jongvolwassen dieren gebruikt doordat onze groep daar ervaring mee heeft. Een andere reden om jongvolwassen dieren in deze studie te gebruiken is door het gebruik hoog vet dieet van 10-12 weken, bij oudere dieren zal de beeldvorming aan het einde van het traject lastiger worden. Daarnaast verkleinen we de kans op epilepsie (WAG/Rij ratten) of dementie (ApoE ratten) door jongvolwassen dieren te gebruiken.

Citaat Bijlage I, Vraag 8.

Vraag DEC: Uw benadering van mentale gezondheid is ook erg open. Kunt u nader aangeven wat u verwacht te vinden? Wat zijn mogelijke pathways? Wat zijn uw hypothesen?

Antwoord: Zoals hierboven benoemd bij vraag 4 en vraag 7, staat de benadering van mentale gezondheid open in ons projectvoorstel omdat er vrijwel niets bekend is over hoe de combinatie van harten vaatziekten en kanker de geestelijke gezondheid beïnvloedt (en andersom). Daarbij hebben we als hypothese dat een verminderde cognitieve en affectieve functie een negatief effect hebben op het beloop van zowel hart- en vaatziekten en kanker. Zowel afzonderlijk als in combinatie. Deze twee

hypothese zullen meer centraal staan in mogelijk vervolgonderzoek, waarbij het huidige PV een eerste aanzet betreft.

Citaat Bijlage I, Vraag 10.

Vraag DEC: Een diepgaandere beschrijving van nieuwvormingen zou in uw projectaanvraag niet misstaan, want het enkel bezigen van de term kanker verhult mogelijk het potentieel aan eminente kennis aangaande de biologie van nieuwvormingen binnen uw onderzoeksgroepen. In dit kader verdient het ook een bespiegeling waarom een zeldzame vorm van nieuwvorming als die van dwarsgestreept spierweefsel is verkozen alsmede een wat minder zeldzame vorm van een niertumor mede met het oog op hun translationale waarde?

Antwoord: De modellen zijn gekozen op basis van:

- 1) De expertise
- 2) Syngene model rhabdo/WAG-Rij ratten en ApoE ratten
- 3) Grotere tumoren met patiënt relevante tumor micro-environment

Hierbij staat het model centraal. Het translationele gedeelte ligt in het feit van de comorbiditeit.

Citaat Bijlage I, Vraag 13.

Vraag DEC: De literatuur leert dat in WAG/Rij ratten mogelijk epilepsie en depressie comorbiditeiten betreffen (10.1016/j.pnpbp.2010.11.010). Bij het gebruik van een dergelijke lijn is het dus de vraag waar de ratten model voor staan m.b.t. mental disorders. Bovendien vermenigvuldigt het aantal comorbiditeiten (u had al atherosclerose, aderverkalking en kanker), wat vragen oproept met betrekking tot validiteit en haalbaarheid van het onderzoek. Kunt u hier een toelichting op geven?

Antwoord: Voor de insteek wat betreft de rol van mentale gezondheid in dit PV, zie de eerdere vragen (o.a. vraag 4 en vraag 7). Verder is het noemenswaardig dat het feit dat deze dieren bijvoorbeeld meer depressie-gerelateerd gedrag vertonen de relevantie van ons onderzoek juist ondersteunt, zowel in relatie tot de interacties tussen ziektebeelden aan sich, alsmede in relatie tot mogelijke onderliggende mechanismen. Overigens kan hierbij niet worden gesteld dat WAG/Rij ratten lijden aan een depressie (hetgeen überhaupt niet van knaagdieren kan worden gesteld). We zien alleen een toename in gerelateerde gedragingen t.o.v. wildtype dieren. In ons voorstel zijn voldoende controlegroepen aanwezig om te concluderen waardoor eventuele veranderingen op het cognitieve en affectieve vlak veroorzaakt worden.

Citaat Bijlage I, Vraag 15.

Vraag DEC: U geeft aan dat: "The rat has been chosen as species based on our extensive experience within cancer therapy, imaging, and experiments addressing mental health (37- 39)." Kunt u ook onderbouwen waarom de rat het beste model is voor het beantwoorden van de vragen die u wilt gaan stellen? De keuze voor de rattenstammen is opmerkelijk (gezien de gevoeligheid voor epileptie). Kunt u meer informatie geven met betrekking tot de keuze voor ApoEtm1sage en WAG/Rij rattenlijnen? Ook wordt niet onderbouwd waarom er twee stammen gebruikt worden (duplicatie aantallen)?

Antwoord: De keuze voor ApoE- en WAG/Rij ratten is op basis van de ziektebeelden gekozen. De ApoEratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model). Omdat dit de opzet is van een nieuw model, weten we niet op voorhand welk model succesvol gaat zijn in het ontwikkelen van co-morbiditeit, of dat ze beide succesvol zijn, daarom nemen we beide invalshoeken mee. We hebben daarenboven ook een strikte go/nogo beslisstrategie meegenomen om een niet-werkend model vroegtijdig te excluseren.

Citaat Bijlage I, Vraag 16.

Vraag DEC: WAG/Rij ratten hebben spontane epileptische aanvallen (met depressief-achtig gedrag als co- morbiditeit) APOE ko ratten zijn al een model voor atherosclerose (AT), alhoewel ook daar blijkbaar discussie over is (Sci Rep . 2018 Apr 3;8(1):5416. doi: 10.1038/s41598-018-23835- z.) en er is een link met Alzheimer. Beide stammen lijken niet per sé bekend te staan om hun tumorgevoeligheid. Wat is dan wel de motivatie voor deze keuze? Kunt u de tumorgevoeligheid van deze stammen onderbouwen met literatuur?

Antwoord: Zie voorgaande vragen. Het feit dat deze dieren meer hersen-gerelateerde problematiek vertonen, toont net de relevante van het bestuderen van het mentale functioneren aan. Dat dit meerdere verschillende problemen betreft heeft grotendeels te maken met een gedeelde etiologie van deze ziektes. De motivatie voor deze ratlijnen is bij vraag 15 uitgelegd, waarbij we de vanuit beide invalshoeken een rattenstam hebben geselecteerd. Een rattenstam die gevoelig is voor atherosclerose/vaatverkalking (ApoE) en een die gevoelig is voor de ontwikkeling van kanker (WAG/Rij). Op PubMed zijn 230 publicaties te vinden over de WAG/Rij ratlijn en de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen (syngene model).

Citaat Bijlage I, Vraag 22.

Vraag DEC: Zou het primaire doel ook eenvoudig weg kunnen zijn 'provide information in the interaction between the diseases atherosclerosis, vascular calcification and cancer'? Dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan lijkt nogal een open deur en aan de andere kant is meten van mentale gezondheid in ratten, als een voorspelling voor menselijke gevoelens, nogal een hachelijke onderneming (hoe hard is dit deel van de wetenschap?).

Antwoord: Het feit dat mensen mentaal geraakt worden door ziekte en nog meer door combinaties daarvan is inderdaad een open deur. Hoe dit alles mogelijk is van invloed is op het beloop van ziekte (en combinaties van ziektes) is dat niet. Zie ook onze antwoorden op onder andere de vragen 4, 5, 7 en 8. Het bestuderen van mentale gezondheid in knaagdieren is inderdaad geen eenvoudige exercitie, doch zeker van bewezen meerwaarde. Angst en cognitie zijn bijvoorbeeld heel goed te meten in knaagdieren.

Citaat Bijlage I, Vraag 28.

Vraag DEC: Bij muizen is het ontstaan van atherosclerose sterk afhankelijk van de genetische achtergrond. Zelfs bij deletie van het apolipoproteïne E gen ontwikkelen CH3 en Balb/c muizen vrijwel geen atherosclerose. Sinds de SD achtergrond blijkaar compatibel is met atherosclerose in de rat, rijst de vraag of de AAV-PCSK9 niet ook in deze achtergrond kunnen worden uitgevoerd.

Antwoord: Zoals hierboven uitgelegd in vraag 15, 16, 25 en 26, beide ratlijnen zijn specifiek geselecteerd vanuit onderzoeksdoeleinden. De ApoE-ratlijn is gevoelig voor het ontwikkelen van atherosclerose en vaatverkalking. Waarbij de WAG/Rij ratlijn het meest gunstig is voor de implementatie van rhabdomyosarcoma cellen. De AAV-PCSK9 invalshoek is gekozen omdat WAG/Rij ratten niet vanuit zichzelf gevoelig zijn voor alleen een hoog vet dieet. Daarentegen hebben deze ratten als voordeel dat het vrijwel de enige ratlijn is waarbij implementatie mogelijk is van rhabdomyosarcoma cellen (uitgezonderd naakte ratten). Om toch atherosclerose en vaatverkalking te implementeren hebben we gekozen voor AAV-PCSK9.

Citaat Bijlage 1, vraag 41.

Vraag DEC: Waarom zijn deze vijf gedragstesten nu precies nodig?

Antwoord: Zie onze antwoorden op onder andere vragen 4-7. Dit onderzoeksvorstel betreft een eerste aanzet om de rol van mentale

	<p>gezondheid in de context van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker te bestuderen. Er is derhalve gekozen voor een algehele (brede screening) op het vlak van cognitie en affect, temeer omdat deze aspecten mogelijkserwijs ook weer het beloop van ziekte kan beïnvloeden.</p> <p>Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden Citaat E1. Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten initieel een pilotstudie in een parallelle onderzoeksopzet met een ondubbelzinnige go/no-go beslisstrategie teneinde een niet-werkend model vroegtijdig te excluderen.</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Citaat E2. Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is met een meerderheidsstandpunt tot stand gekomen.</p> <p>Het minderheidsstandpunt werd ingenomen op basis van de volgende twee argumenten:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Het wordt in het onderhavige onderzoeksvoorstel onvoldoende duidelijk gemaakt of onderzoek bij mensen niet meer voor de hand liggend is (zeker ten aanzien van mentale aspecten) en aldus ook van belang met het oog op reductie. - Tevens vindt het betreffende lid de keuze voor de beide soorten nieuwvorming onvoldoende onderbouwd en geeft aan dat wil een model enige relevantie hebben voor uiteindelijke vertaling naar de mens er dan toch tenminste een veelvoorkomende vorm van nieuwvorming (die ook vaak leidt tot mentale effecten) bij mensen moet worden geselecteerd.
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Citaat B4. 5.1 lid2h</p>
	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze het minderheidsstandpunt weer en de bijbehorende argumenten. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat. Ultimate goal We aim to establish a multi-modal disease model studying the molecular and biological effects of atherosclerosis, vascular calcification, and cancer. This pilot will provide important information on the interaction between those diseases.</p> <p>Aim 1. Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats The first aim is very important for the establishment of the multi-model disease model, since we aim to achieve a model containing atherosclerosis, vascular calcification, and tumour growth, which is only achievable when the required level of atherosclerosis and vascular calcification is met (any form of plaque build-up) (40, 41). For this purpose, the disorder levels will be determined via terminal PET/SPECT and 2- photon intravital microscopy experiments with probes for these specific disease pathways that will be tested in sequential analysis in the same animal. To achieve this aim, we have defined a set of immediate subaims (a detailed description is provided in section 3.4.):</p> <p>1.1 Establish an atherosclerotic model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent atherosclerosis can be established in WAG/Rij and SD Apoetm1sage rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.1, Figure 2).</p> <p>1.2 Establish a calcification model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent calcification can be established in WAG/Rij and SD Apoetm1sage rats, whereby one or both rat strains will be selected based on the imaging techniques or blood analysis for further aims (e.g., aims 1.3 and 3.2, Figure 2).</p> <p>1.3 Establish a vascular disorder model in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats These experiments will determine to what extent atherosclerosis and vascular calcification can be induced in one model, establishing a vascular disorder model. This model will be further used in aim 2 (Figure 2).</p> <p>Aim 2. Establish a multi-morbidity model containing vascular disorders and cancer When the experimental approach leading to atherosclerosis and vessel calcification has been determined, aim 2 will be conducted to establish tumour growth in addition to atherosclerosis and vascular calcification</p>
---	--

pathologies (37). These experiments will determine to what extent vascular disorders can be combined with cancer in one model, multi-morbidity model, combining the two most health treating disorders.

Aim 3. Study the underlying mechanisms between vascular disorders and cancer

When the experimental approach leading to a multi-morbidity model has been determined, aim 3 will be conducted to further discover the underlying mechanism connecting these pathologies. To achieve this aim, we have defined a set of immediate sub-aims (a detailed description is provided in section 3.4.):

3.1 Establish a multi-morbidity model with atherosclerosis and cancer in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats The established atherosclerosis model of aim 1.1 will be extended by induction of cancer in WAG/Rij and/or SD-Apoetm1sage rats.

3.2 Establish a multi-morbidity model with calcification and cancer in WAG/Rij and SD-Apoetm1sage rats One or both rat strains from aim 1.2 are selected to determine to what extent calcification and cancer can be established in WAG/Rij and/or SD-Apoetm1sage rats.

Aim 4. Study the influence of atherosclerosis, vascular calcification and/or cancer on mental health

To study if vascular disorders and tumor growth affects the well-being of the animals affect cognition and affect-related behaviors, several non-invasive behavioral tests will be performed. More specifically, for this purpose, during all three aims, before exposing the animals to the various imaging modalities, the cognition- and affect-related behavioral effects of genetic variation (WAG/Rij & SD-Apoetm1sage) and the distinct (phased) interventions (atherosclerosis, vessel calcification and tumorigenesis) will be examined to assess to which extent physical multi-morbidity in the context of this project contributes to variations in mental health of the animals. To control for physical limitations that may impact on performance in the various behavioural test, overall locomotor performance will be studied as well (42). This aim will be implemented over all three aims.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>In the current aging population, more and more patients present with multi-morbidity, i.e., with multiple co-existing chronic diseases. It has been shown that patients that are presented to the clinic with a chronic disease will develop a second chronic condition with a very high likelihood. We want to investigate why there is a great chance of having multiple chronic disorders. It is likely that the chronic diseases with these patients present interact. There are 7 major groups of chronic disease, whereby vascular diseases, cancer, and mental disorders are three of them. However, interactions between atherosclerosis, vascular calcification, mental disorders, and cancer have not been studied in detail even though e.g., cancer patients/survivors often also suffer from cardiovascular disease (8, 43-46). A potential shared mechanism of chronic diseases is senescence or pre-mature ageing of stem cells accounting for multiple diseases.</p> <p>Society as a whole is suffering from increased healthcare costs which are at least partly due to increasing numbers of patients that present with multi-morbidities and chronic disease. Additionally, expenditures per capita increase dramatically in patients with a chronic condition. It is estimated that approximately 83% of all healthcare money is spent on chronic conditions, five times larger compared to patient without chronic disease (47).</p> <p>By sharing our work to other scientists and clinicians, we will contribute to a vital, dynamic and transparent knowledge sharing culture. Moreover, with our research, we aim to establish an animal model for multimorbidity in order to study interactions between pathologies.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat C7. Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met vergelijkbare proefdiermodellen, de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Proc Natl Acad Sci USA, Circ Res, Nutrients, Int J Mol Sci en Nature.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>Due to the complexity of the pathologies studied (atherosclerosis, cancer and vascular calcification) it is currently not possible to use in vitro alternatives when studying these pathologies separately. The current proposal aims to investigate how these different pathologies influence each other by establishing an animal model for multi-morbidity by combining the above-mentioned pathologies. Hence, we can only use an in vivo approach. The proposed studies including ex vivo validation and uptake of imaging agents in organs such as tumor, vessels, and brain cannot be performed in humans.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>The design of the experiments and the stepwise procedure being followed between the different objectives, allows us to reduce the number of animals significantly. We have put in place strict go/no-go decisions for efficacy evaluation experiments: when these criteria are not met, further experiments will not be performed (Figure 2 and 3 of the proposal). Furthermore, we aim to combine several outcome parameters (e.g. in vivo imaging followed by ex vivo imaging) in order to use the animals as efficiently as possible to lower animal numbers.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health: Citaat.</p> <p>We have extensive experience with animal models for atherosclerosis, vascular calcification and cancer, and the required methods, regarding the pathologies that will be studied (atherosclerosis, vascular calcification, and cancer). Our previous practical experience in mice and rats will allow us to reduce discomfort as much as possible. Invasive techniques will be performed by experienced well qualified personnel. Studying cognition and affect will allow for more insight into possible adverse effects for the animals and will allow redesigning future experiments taking into account animal welfare.</p>
Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Dodens volgens richtlijn?
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health	HEP: <10%	<p>Animals will be monitored at least daily for signs of discomfort. In consultation of the IvD an action table will be defined which includes actions to be taken at specific predefined clinical scores on welfare related criteria and based on which observations HEP's should be applied. Clinical signs of pain, discomfort (general malaise) and stress will be assessed based on clinical signs of awareness, posture, motivation to perform normal species-specific behaviour, social interaction, reaction when handled, facial expression, gait, body condition, bodyweight, coat condition, porphyria, breathing pattern, colour mucosa, faeces, and animal model specific criteria such as tumor development and size, skin lesions.</p> <p>HEP will be based on:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acute bodyweight loss (> 15 % weight loss in 1-2 days) or progressive bodyweight loss before reaching 20% weight loss. Corrections will be included for tumour growth. 2. Tumor growth interfering with normal behaviour or locomotion. 3. Tumor growth associated with pain, which cannot be alleviated with analgesic treatment. 4. Tumor growth associated alternations in overlying skin structure, e.g., necrosis preceding skin break through 5. Tumor size of more than 15 cm³ 6. Anaemia as indicated by symptoms such as pale feet, ears or mucosa, or haematological measures Coagulation problems after injections resulting in hematoma formation or prolonged bleedings (unstoppable) 7. Failure to eat or drink over a 24h period resulting in dehydration 8. Bloodstained or mucopurulent discharge from any orifice 9. Laboured respiration 10. Nasal discharge and/or cyanosis 11. Diarrhoea (soft faeces) over a 48-h period
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

Het betreft een aanvraag die al meer dan 2 jaar geleden is ingediend bij de IvD, al eerder beoordeeld is door de 5.1 lid2h en vervolgens ingetrokken is door de aanvragers i.v.m. een negatief 5.1 lid2h advies. De aanvragers hebben het PV herschreven en opnieuw ingediend. 5.2 lid1

Het betreft een fundamentele projectaanvraag met als doel het opzetten van een multimodaal ratmodel, het belang van het project hangt echter samen met het uiteindelijke doel (ontwikkelingen van diagnose en behandelingen voor humane patiënten) en de translationele waarde van het nog te ontwikkelen multimodale ratmodel.

Uit correspondentie met de DEC (Bijlage I, vraag 5 en 10) blijkt dat dit onderzoek niet primair gebaseerd is op de translatie naar de patiënt, maar vooral gericht op de opzet van het multimodale model. De keuze voor SD-ApoE ratten heeft te maken met de inductie van atherosclerose en vaatverkalking waar deze rattenlijn gevoelig voor is, 5.2 lid1

De keuze voor het Syngene model rhabdo/WAG-Rij ratten heeft te maken met het type kanker (de implantatie van rhabdomyosarcoma cellen). Er is geopteerd om een tweetal verschillende vormen van kanker te onderzoeken, te weten een maligne neoplasie van dwarsgestreepte spiercellen (Wag-Rij ratten) en een renale neoplasie op basis van RK3E-ras (SD-ApoE ratten). Dit is volgens de DEC echter een zeldzame vorm van nieuwvorming (zie Bijlage 1, vraag 10) en dit is voor een van de DEC-leden reden geweest om een minderheidsstandpunt in te nemen.

5.2 lid1

Desondanks zijn het vormen van kanker die, zij het in relatief beperkte frequentie, ook bij de mens voorkomen. Het Secretariaat heeft, ondanks de vragen van de DEC, de aanvrager nogmaals in de gelegenheid gesteld om de modelkeuze en de transleerbaarheid hiervan verder toe te lichten.

De nadruk van deze aanvraag ligt op het opzetten van een multimodaal diemodel voor het bestuderen van de interactie tussen atherosclerose, vaatverkalking en kanker. De aanvrager wil in deze aanvraag echter ook mentale effecten van de ziektebeelden onderzoeken. 5.2 lid1

5.2 lid1



In bijlage 1 worden heldere go/no-go momenten geformuleerd. In de correspondentie met de DEC geeft de aanvrager aan 'strikte go/no-go criteria' te hanteren tussen aim 2 en 3, deze zijn echter niet terug te lezen in het projectvoorstel. De aanvrager is verzocht om de go/no-go criteria tussen aim 2 en 3 te specificeren.

De DEC stelt voor om, in verband met 'minder strikte go/no-go criteria', een voorwaarde aan het project te verbinden. te weten:

"Only the model with effective development of atherosclerosis and vascular calcification will be further investigated in aim 2 and 3."

5.2 lid1



6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1



De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10700202216259
Bijlagen
3

Datum 31 januari 2023
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte dr. 5.2 lid1

Op 14 juli 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health" met aanvraagnummer AVD5.1 lid2h 202216259. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 31 januari 2023 tot en met 30 juli 2027.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 7 december 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 30 december 2022 en 9 januari 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de te ontwikkelen ziektemodellen, het verband tussen mentale gezondheid en hart- en vaatziekten en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

31 januari 2023

Aanvraagnummer:

AVD 5.1 lid2n 202216259

Overwegingen

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. In de ogen van de CCD is een pilot met parallelle opzet niet nodig, omdat door de aanvrager voldoende concrete go/no-go criteria zijn opgenomen tussen de verschillende projectdoelen.

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: 0800 789 0789.

Datum:

31 januari 2023

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2h** 202216259

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 31 januari 2023 tot en met 30 juli 2027, voor het project "Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health" met aanvraagnummer AVD^{5.1 lid2h} 202216259, na advies van ^{5.1 lid2h}

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is ^{5.1 lid2e} Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 14 juli 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 december 2022;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health, zoals ontvangen op 7 december 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 19 februari 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 7 december 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 19 januari 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Development of a multi-modal animal model with atherosclerosis, vascular calcification, cancer influencing mental health			
	Ratten (Rattus norvegicus) / SD Apoetm1sage, Wag/Rij	440	100,0% Matig

Geldende voorschriften

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

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.

Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 202216259

- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD^{5.1 lid2n} 202216259

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:AVD 5.1 lid2f 202216259

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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