

(subtypes of) senescence in pathology-affected human/mouse tissues vs. health controls (>20% increase in senescence markers, determined in for example immunohistochemistry or qPCR experiments). This is true for the vast majority of the examples we have described in our appendices (which I also reviewed in²). There are plenty more, which is why we proposed an initial selection. For instance, senescence (unfortunately not identified which subtype) is elevated for many normal tissues during aging, but also for diseases as ALS, or treatments such as Ischemia-Reperfusion-Injury, High-Fat/Sucrose diet or chemotherapy. In many cases, genetic ablation of senescence proved to be beneficial in mouse models.

We will need to set up the respective disease models of which we know/anticipate senescence to drive a given pathology. For instance, in case of the models described above, this is known, but we would still need to determine when the best window of opportunity exists, insofar this is not yet determined before. **We will determine whether we are able to measure relevant health parameters in these models and whether these change significantly during disease progression. For example, relevant blood values (e.g Urea, AST, creatinine) should show more than 25% impairment compared to control animals or a CT scan should show at least 10% loss of tissue density (e.g. bone or muscle) during disease progression.** Eventually, we will cross the most potent senescence-detection models into the disease models (all within reason) to be able to follow senescence subtype development in time, along with disease progression. Only models for which we observe senescent cells in association with the respective pathology will be considered to pass the go-/no-go point.

Besides aging models, we will optimize cancer models as well. We will employ (patient-derived) cancer cell lines that exhibit a sufficient take rate (>30% of injected mice should form tumors or metastases), an optimal growth rate (a workable tumor should arise within half a year) and form a sufficient amount of metastasis (at least 5), when metastasis models are required. These are the minimal number required, but we aim for an even higher take rate, growth rate and number of metastasis.

The **third go-/no-go** benchmark of the project (Phase 2) is to identify the window(s) of opportunity at which our compounds are likely to be effective (sigma and delta determination for the power analysis) and progress with those that show sufficient promise.

We will perform pilot experiments in the respective senescence-detection and disease model(s) and determine efficacy against the senescence-associated pathology. One single pilot model may not be sufficient to move forward and multiple models would thus need to be investigated (all within reason and with as few animals as required). Likely, we will need to initiate a few of such pilot experiments, e.g. an aging model, a chemotoxicity model and a cancer model.

In parallel, we will determine whether there is no obvious toxicity, e.g. by determining (declined) physical appearance/behavior and unfavorable blood values (reduced ABC counts, measurable metabolites indicative of organ toxicity). **A workable window of opportunity is for example determined by a decrease in senescence (subtype) signal after treatment, an improvement of relevant blood values, an increase in bone density or an increase in muscle mass. In cancer models, this will be determined by measuring tumor volume or the number and volume of metastases. Based on these results we can calculate group sizes required for significant differences in follow-up experiments. Differences between control and experimental groups are large enough when these calculations result in groups smaller than 20 animals.**

Note: Our goal is to invest a lot in this phase by in setting up the right models and thereby to avoid unnecessary redundancy later on. Nonetheless, we strive to keep this part of the project as short as possible when the pilot experiments are favorable, and then progress to a "real" experiment with the appropriate power analysis.

Note 2: Drugs that are effective against one, do not necessarily have to be successful against the other(s) and, vice versa, drugs that fail against one can well be effective against the others – as has also been shown in literature for older compounds. As is often the case with pilot experiments, it should already be possible to tell whether a treatment showed at least some initial effectivity, for instance by post mortem staining of tissues for senescence and other markers. Only models/drug combinations which show a workable window-of-opportunity in the pilot experiment we be studied further.

The **fourth go-/no-go** benchmark of the project (Phase 3) is to determine whether a particular anti-senescence compound is safe and effective in a full-scale experiment. Here, a compound that showed promise in the pilot phase will be tested more broadly in an initial selection of models for age-related senescence (appendix 1+2), therapy-induced senescence (appendix 2), primary tumors (appendix 3+5) and metastases (appendix 4+5). Such experiments will be carried out within reason and not all at once. Most likely, we will test the compound(s) in a larger cancer experiment and in a larger aging experiment.

When successful in these initial – larger- experiments, the compound(s) will be tested in additional models within the respective categories. For instance, for the aging pillar, additional age-related diseases would be tested where the respective senescence subtype is hypothesized to play a role. For cancer, additional types of cancer would then be included. **In general, primary outcome parameters should be significantly improved in one model before a compound can be tested in a second model. Examples are a 10% lifespan extension or a 10% improvement in relevant blood values.** This is for instance similar to what has successfully be done before for

immunotherapy. That therapy proved to be effective against a range of solid tumors, not one single type. We envision a similar trajectory for anti-senescence compounds. This will generate a set of compounds that are effective against different pathologies.

The **fifth go-/no-go** benchmark (Phase 3) is to test compounds that showed promise in at least one of the full-scale experiments for pre-IND in vivo work - required for clinical translation to be feasible.

Some pre-IND work can be outsourced, but a lot can (and should) be performed in-house. These include basic safety/toxicity studies, tissue distribution of the drug, Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD), ADME etc. Much will be performed in vitro, but the regulatory bodies require in vivo follow up for most. Examples of what we would thus study include, PET/SPECT-tracing of our (the isotope-labelled) peptides, the half-life of the compounds in the blood and the tissue distribution of (e.g. FITC-labelled or Halonium-labeled) peptides over time. This is still part of the current in vivo project. Typically a half-life of at least a day is required and no major immunotoxicity or hematological toxicity is allowed. As for distribution, the tissue of where the pathology is investigated needs to be sufficiently reached. E.g. in case of Gbm, the Blood-Brain-Barrier needs to be sufficiently passed in the time-frame of the experiment. In case of experiments directed at overcoming therapy resistance in cancer, sufficient levels of the drug need to penetrate the therapy-resistant metastases. Only compounds which have a sufficient half-life and biodistribution will be considered for further analysis.

The **sixth go-/no-go** benchmark (phase 4), would then progress beyond the scope of this proposal would be for a compound to enroll into and IND trajectory of clinical translation/ Last, a drug that passes the Pre-IND requirements, such that it has a favorable PK/PD, bioavailability etc., would qualify for clinical translation. This is the **sixth go-/no-go** benchmark, after which this project is no longer PRE-clinical, but becomes fully clinical and is then out of the scope of this project.

It is important to have a clear **overview of the procedures the mice will be exposed to and the measurable (end-)points of the experiments.** These will consist of:

A) Imaging techniques. These include, again within reason, techniques such as IVIS, intravital fluorescence-based imaging and radiation or audio-based imaging, such as CT, MRI, SPECT and/or PET. These we have (mostly) used before and will occur in collaboration where not. Clearly, they will not be applied all at once in the same animal. We have also experienced that imaging often affects the functional biology. We strive to make use of a combination of 2-3

imaging techniques over time in the same mice (e.g. CT/IVIS/FMT can easily be combined with minimal added discomfort), but then do the functional biology in a separate set for those reasons.

B) (in a subset of mice): surgery. This is particularly true for some of the cancer models where the tumor cells/PDX need to be implanted. This will happen under anesthesia and analgesia, which we have done before and are experience with.

C) Functional analyses, including assessment of healthspan parameters, such as physical well-being (grip strength, rotarod etc.) and appearance (Photographs), behavior (movies and behavioral assays as Y-maze), musculoskeletal analysis and investigation of Tissue/blood/Urine/Feces markers. In general, these are not particularly invasive techniques.

D) (For the cancer aspect) Tumor migration and progression-free and overall survival.

When a novel therapeutic shows significant results in any of the proposed experiments, it may be tested in additional animal experiments (described in other appendices).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

To achieve the main objective described in 3.4.1, the proposal is subdivided into distinct types of components, based on the similarity of procedures and measurable endpoints. In all components, the common goal is to assess whether senescence (subtype)-targeting compounds can improve disease outcome.

The distinct mouse experiments part of this proposal include:

1. Effects of senescence (subtype)-targeting compounds in models for (accelerated) aging, chemotoxicity and age-related pathologies. (Appendices 1 and 2).

- a. Allow the mice to age naturally or to be subjected to a diet- or therapy-induced phenotype (e.g. high-fat diet, or Ischemia-Reperfusion Injury or chemotherapy-induced accelerated aging).
- b. Analyze health parameters by imaging techniques (mainly IVIS, CT and intravital imaging, but other when applicable such as PET/SPECT), functional analyses and blood parameters.
- c. Collect tissues from some mice for analysis of senescence/aging markers
- d. In a cohort independent of c., treat the mice with senescence-subtype drugs, where the goal is to induce changes in health after clearance of specific senescence subtypes.
- e. The end-points as such would be to again perform the imaging and functional analyses. From experience, we know that usually imaging and functional analyses in

the same animal can be a burden. As such, there may be a division in cohorts used for functional analyses and for imaging, although we aim to do multiple of these within the same animals to contribute to the 3Rs, mainly "refinement". This should all be within reason. The well-being of the animals is of the highest priority here and also the outcome of the experiments only make sense if not too much happens in the same mice at once.

2. Effects of anti-cancer/senescence (subtype)-targeting compounds against primary cancer growth, metastases and therapy resistance. (Appendices 3,4,5).

- a. Given the potential of our drugs to target the three distinct phenotypes of primary tumor growth, metastases and therapy resistance in vitro, this part of the project is split into different "starting points" – with the measurable endpoints /therapeutic outcomes being rather similar. These starting points are:
- Injection of cancer cells into the appropriate target site to induce growth of a primary tumor. This will either be a cancer cell suspension, a 3D tumor organoid in gel, or a piece of solid tumor (patient-derived xenograft). We initially envision this to be done for Glioblastoma multiforme in the brain, for mammary carcinoma in the mammary fat pads, for colorectal cancer in the colon and for melanoma subcutaneously.
 - Formation of metastases, either to spontaneously develop from a primary tumor, or by injection of metastatic cancer cells into the blood stream. The first strategy allows for studies on the effect of novel therapeutics on metastasis formation, while the second strategy provides information on the efficacy of therapies in killing metastatic cancer cells.
 - The use of GEMMs (Genetically engineered mouse models) which spontaneously develop primary cancer and/or metastases. As one illustrative example, we will for instance make use of mice which carry (inducible) oncogenic BRAF/RAS mutations and which after activation spontaneously develop tumors. Also models for the other types of cancer will be incorporated, e.g. for colorectal carcinoma mice with APC/KRAS/TP53/SMAD4 mutations, etc. This list is not fully predetermined of course, but the concept remains the same.

The primary outcome parameters are dependent on the type of experiment and the type of pathology studied. In many cases, the focus will be on improving "healthspan" as a whole, with specific parameters that vary per experiment.

In principle this means:

- 1) Changes/improvements in biological/physiological parameters:

In case of (age-related) pathologies and induced senescence (appendix 1-2), these can for instance be:

- Blood, urine and feces values, as readout for overall well-being, as well as tissue-specific health/toxicity.
- Physical appearance and behavior, as readout for overall well-being
- Disease-specific parameters. These are very dependent on individual criteria per experiment. To give some examples: In case of sarcopenia/cachexia, this could be long-term muscle volume/mass. In case of natural aging, this could be overall survival. In case of IRI experiments, this could be long-term graft function.

In case of cancer (appendix 3-5), this can (additionally) for instance be:

- Primary tumor burden/size, metastasis burden/quantity, e.g. using the described imaging techniques
- Progression-free and overall survival

2) Changes/improvements in process-specific parameters

- Reduction/alteration of senescence subtypes/stemness, using the described imaging techniques for bulk analysis (IVIS, FMT), or individual cell tracking (intravital imaging)
- Reduction/alteration of senescence subtypes/stemness, using post-mortem analysis of individual tissues

A rough outline of the procedures could be as follows:

- Analyze health parameters and tumor growth by imaging techniques (mainly IVIS, CT and intravital imaging, but other when applicable such as PET/SPECT), functional analyses and blood parameters.
- Treat the mice with chemo-/radiotherapy and/or senescence-subtype drugs. Typically, we would treat the mice with the senescence (subtype) drugs after they have first been exposed to chemo-radiotherapy, but proper controls are of course needed in with either one alone or neither are given. Moreover for some types of cancer, no chemo-radiotherapy may be needed in the first place as these already show senescence markers
- Repeat b.
- Measure progression-free survival and overall survival at which we will implement the humane endpoints as to avoid suffering.

Note: at intervals prior, during and after treatment we will collect tissues from a subset of mice for analysis of the effects of treatment on tumor growth, the tumor microenvironment and senescence/stemness markers.

Of note: The compounds we wish to test are expected to be effective based on the "damage state" of the cancer cells, rather than the type of cancer. This can for instance be triggered because they survived an earlier chemo-/radiotherapy. Moreover, it is expected that multiple cancers express senescence features that can be targeted and specific features are likely to be shared by distinct cancer types. As is nowadays for instance also seen for immunotherapy, we therefore expect our compounds to be treatment-specific, rather than being specific for a particular type of cancer. As such, we ask permission to perform quite similar experiments, but for different types of cancer; in their own applicable model.

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

Coherence

The coherence between our components is that in all cases, we are interested in a) deciphering how (subtypes of) cellular senescence are deleterious to health -either aging or cancer-, and b) whether drugs that we developed and tested extensively *in vitro* are effective to restore health / improve disease outcome. This would have huge implications for human translation.

Novel drugs tested in the proposed experiments target senescent cells and senescence features in cancer cells *in vitro* (selection criteria)

Milestones

In order to mitigate the unnecessary use of mice and the burden of individual animals, we will incorporate several **go/no-go decision moments** and milestones (see also the scheme above):

- 1) *In vitro* /*ex vivo* efficacy. Only compounds with are sufficiently selective and potent against senescent (subtype) cells or senescence-like cancer cells will be allowed to progress to the *in vivo* stage of this proposal
- 2) Model selection. Prior to testing anti-senescence compounds, we will assess whether an envisioned model shows sufficient levels of senescence (subtypes) or senescence-like cancer cells.
- 3) Pilot experiments. Prior to the initiation of large-scale experiments, we will perform pilot experiments to get an initial indication of the rough window of opportunity and of the sigma and delta to be used in our power analyses.

4) After successful pilot observations, we will initiate the anti-age related pathology or anti-cancer experiments for a subset of models. This will be within reason, e.g. a low number of models. For instance, we would initially test the senescence (subtype)-targeting drug in a model for aging, a model for chemotoxicity (e.g. doxorubicin) and cancer (e.g. an implantation model). Should these be completely non-promising, we would not progress. In case of partial success or indications of optimization, we would test a low number of additional models.

5) When these initial experiments eventually show promise, we will progress to testing additional models. When successful, this list would be expanded. If not, then this would be a re-evaluation moment to decide to either optimize the protocol (in case at least some effects are seen), or to drop the compound from further analysis.

6) Should step 4 be successful, we will partially progress to (pre-)IND enabling studies. Here, experiments to determine the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the drugs are analyzed before clinical investigation can commence. The majority of this work would be outsourced, but within reason some experiments will be performed under this protocol, such as tissue distribution and half-life determination.

References:

- 1 Vaupel, J. W. Biodemography of human ageing. *Nature* **464**, 536-542, doi:10.1038/nature08984 (2010).
- 2 de Keizer, P. L. The Fountain of Youth by Targeting Senescent Cells? *Trends Mol Med* **23**, 6-17, doi:10.1016/j.molmed.2016.11.006 (2017).
- 3 Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* **75**, 685-705, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183653 (2013).
- 4 Coppe, J. P. *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* **5**, e9188, doi:10.1371/journal.pone.0009188 (2010).
- 5 Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* **24**, 1246-1256, doi:10.1038/s41591-018-0092-9 (2018).
- 6 Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189, doi:10.1038/nature16932 (2016).
- 7 Baar, M. P. *et al.* Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **169**, 132-147 e116, doi:10.1016/j.cell.2017.02.031 (2017).
- 8 Demaria, M. *et al.* Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* **7**, 165-176, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241 (2017).
- 9 Hernandez-Segura, A., Brandenburg, S. & Demaria, M. Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells. *J Vis Exp*, doi:10.3791/57782 (2018).
- 10 Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12072-12077, doi:10.1073/pnas.211053698 (2001).

- 11 Wiley, C. D. *et al.* Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence. *Aging Cell* **16**, 1043-1050, doi:10.1111/accel.12632 (2017).
- 12 Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236, doi:10.1038/nature10600 nature10600 [pii] (2011).
- 13 Watanabe, K. *et al.* Age-related dysfunction of the DNA damage response in intestinal stem cells. *Inflamm Regen* **39**, 8, doi:10.1186/s41232-019-0096-y (2019).
- 14 Mosteiro, L. *et al.* Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* **354**, doi:10.1126/science.aaf4445 (2016).
- 15 Milanovic, M. *et al.* Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **553**, 96-100, doi:10.1038/nature25167 (2018).
- 16 Coppe, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6**, 2853-2868, doi:08-PLBI-RA-2566 [pii] 10.1371/journal.pbio.0060301 (2008).
- 17 Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019-1031 (2008).
- 18 Acosta, J. C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006-1018, doi:10.1016/j.cell.2008.03.038 (2008).
- 19 Lehmann, J., Baar, M. P. & de Keizer, P. L. J. Senescent cells drive frailty through systemic signals. *Trends in Molecular Medicine* (**Accepted**) (2018).
- 20 Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973-979, doi:10.1038/ncb1909 ncb1909 [pii] (2009).
- 21 Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868 (1999).
- 22 Kops, G. J. *et al.* Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**, 630-634 (1999).
- 23 Kops, G. J. *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**, 316-321 (2002).
- 24 de Keizer, P. L. *et al.* Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer research* **70**, 8526-8536, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1563 (2010).
- 25 Chung, Y. M. *et al.* FOXO3 signalling links ATM to the p53 apoptotic pathway following DNA damage. *Nat Commun* **3**, 1000, doi:10.1038/ncomms2008 (2012).
- 26 Baar, M. P. *et al.* Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **169**, 132-147 e116, doi:10.1016/j.cell.2017.02.031 (2017).
- 27 Demaria, M. Gene therapy for p16-overexpressing cells. *Aging (Albany NY)* **10**, 518-519, doi:10.18632/aging.101422 (2018).
- 28 Kruiswijk, F. *et al.* Targeted inhibition of metastatic melanoma through interference with Pin1-FOXO1 signaling. *Oncogene* **35**, 2166-2177, doi:10.1038/onc.2015.282 (2016).
- 29 Milanovic, M., Yu, Y. & Schmitt, C. A. The Senescence-Stemness Alliance - A Cancer-Hijacked Regeneration Principle. *Trends Cell Biol* **28**, 1049-1061, doi:10.1016/j.tcb.2018.09.001 (2018).
- 30 de Boer, J. *et al.* A mouse model for the basal transcription/DNA repair syndrome trichothiodystrophy. *Mol Cell* **1**, 981-990, doi:S1097-2765(00)80098-2 [pii] (1998).
- 31 de Boer, J. *et al.* Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* **296**, 1276-1279, doi:10.1126/science.1070174 1070174 [pii] (2002).

- 32 Burtner, C. R. & Kennedy, B. K. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 567-578, doi:10.1038/nrm2944 (2010).
- 33 Gluck, S. *et al.* Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* **19**, 1061-1070, doi:10.1038/ncb3586 (2017).
- 34 Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* **23**, 2066-2075, doi:10.1091/mbc.E11-10-0884 (2012).
- 35 Baar, M. P., Van Willigenburg, H. & de Keizer, P. L. J. Maintenance and repair of an aging life cycle. *Oncotarget* **8**, 86985-86986, doi:10.18632/oncotarget.18046 (2017).
- 36 Zhang, H., Kieckhafer, J. E. & Cao, K. Mouse models of laminopathies. *Aging Cell* **12**, 2-10, doi:10.1111/accel.12021 (2013).
- 37 Liu, B. *et al.* MDM2-mediated degradation of WRN promotes cellular senescence in a p53-independent manner. *Oncogene* **38**, 2501-2515, doi:10.1038/s41388-018-0605-5 (2019).
- 38 Barnhoorn, S. *et al.* Cell-autonomous progeroid changes in conditional mouse models for repair endonuclease XPG deficiency. *PLoS genetics* **10**, e1004686, doi:10.1371/journal.pgen.1004686 (2014).
- 39 Reijne, A. C. *et al.* Running wheel access fails to resolve impaired sustainable health in mice feeding a high fat sucrose diet. *Aging (Albany NY)* **11**, 1564-1579, doi:10.18632/aging.101857 (2019).
- 40 Braun, H. *et al.* Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival. *J Am Soc Nephrol* **23**, 1467-1473, doi:10.1681/ASN.2011100967
ASN.2011100967 [pii] (2012).
- 41 Melk, A. *et al.* Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* **65**, 510-520, doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x (2004).
- 42 Schafer, M. J. *et al.* Exercise Prevents Diet-Induced Cellular Senescence in Adipose Tissue. *Diabetes* **65**, 1606-1615, doi:10.2337/db15-0291 (2016).
- 43 Escande, C. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell* **13**, 951-953, doi:10.1111/accel.12235 (2014).
- 44 Baar, M. P., Perdiguero, E., Munoz-Canoves, P. & de Keizer, P. L. Musculoskeletal senescence: a moving target ready to be eliminated. *Curr Opin Pharmacol* **40**, 147-155, doi:10.1016/j.coph.2018.05.007 (2018).
- 45 Bussian, T. J. *et al.* Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* **562**, 578-582, doi:10.1038/s41586-018-0543-y (2018).
- 46 Chinta, S. J. *et al.* Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep* **22**, 930-940, doi:10.1016/j.celrep.2017.12.092 (2018).
- 47 Dhomen, N. *et al.* Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* **15**, 294-303 (2009).
- 48 Burd, C. E. *et al.* Mutation-specific RAS oncogenicity explains NRAS codon 61 selection in melanoma. *Cancer Discov* **4**, 1418-1429, doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0729 (2014).
- 49 Martin, E. S. *et al.* Development of a colon cancer GEMM-derived orthotopic transplant model for drug discovery and validation. *Clin Cancer Res* **19**, 2929-2940, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2307 (2013).
- 50 Huijbers, I. J. *et al.* Rapid target gene validation in complex cancer mouse models using re-derived embryonic stem cells. *EMBO Mol Med* **6**, 212-225, doi:10.1002/emmm.201303297 (2014).
- 51 Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722-733, doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012 (2014).
- 52 Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* **114**, 1299-1307, doi:10.1172/JCI22475 (2004).

- 53 Hernandez-Segura, A. *et al.* Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* **27**, 2652-2660 e2654, doi:10.1016/j.cub.2017.07.033 (2017).

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Analysis of senescence heterogeneity and the potency of anti-senescence (subtype) compounds during aging and age-related pathologies
2	Analysis of senescence heterogeneity and the potency of anti-senescence (subtype) compounds during acute induction, e.g. chemotherapy, and the associated -toxicity
3	Analysis of senescence heterogeneity and the potency of anti-senescence (subtype) compounds in cancer, starting from primary tumors
4	Analysis of senescence heterogeneity and the potency of anti-senescence (subtype) compounds in cancer, starting with metastases models
5	Analysis of senescence heterogeneity and the potency of anti-senescence (subtype) compounds in cancer, starting from genetically engineered modified mice (GEMMs)
6	
7	
8	
9	
10	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD10300202010305 / 2020-0019
2. Titel van het project: Effect of voluntary exercise on recovery after an ischemic stroke in high-fat diet induced obese **10.1 c en 10.2 g**
3. Titel van de NTS: Het effect van lichaamsbeweging op herstel na een herseninfarct bij muizen met obesitas
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 04-08-2020, eerder ontvangen op 02-07-2020
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 11-08-2020 en 13-10-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 17-08-2020 tot 07-10-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 07-10-2020
 - advies aan CCD: 26-10-2020
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 17-08-2020
 - Datum antwoorden: 07-10-2020
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Algemeen:

De commissie heeft uw responsbrief en herziene aanvraag besproken. Bij de bespreking bleken er meerdere onduidelijkheden te zijn die een juiste inschatting van het belang van deze experimenten in de weg staan. Ook is het voor de commissie lastig te zien welke verandering u in het project heeft aangebracht. Hoewel dit niet door de CCD wordt gevraagd, is het voor de commissie van belang in één oogopslag te kunnen zien welke veranderingen u heeft aangebracht in de oorspronkelijke aanvraag. Hieronder vindt u de vragen die commissie nog heeft voordat er een advies gegeven kan worden.

Project Proposal:

- In uw inleiding geeft u aan dat obesitas een risicofactor is voor een herseninfarct. Om het translationeel belang van uw onderzoek te onderstrepen schrijft u op pagina 15 van uw antwoordbrief dat obesitas voorkomt in onze maatschappij met een frequentie van 50%. Dit is volgens de commissie erg hoog ingeschat, temeer daar u elders, in de eerst alinea van de aanvraag, de grens lijkt te trekken bij een BMI van 30. De commissie vermoedt dat het percentage van 50% betrekking heeft op mensen met overgewicht (BMI >25). Ook ontbreekt een literatuurreferentie voor het getal dat u noemt. De commissie verzoekt u overal dezelfde definitie van obesitas te hanteren.

Antwoord: De opmerking van de commissie is terecht: In de projectaanvraag hebben wij overgewicht gedefinieerd als een BMI ≥ 25 kg/m² en obesitas als een BMI ≥ 30 kg/m². In onze maatschappij (Nederland) komt overgewicht voor met frequentie van 48%, waarvan 11% obesitas. De reactie in onze antwoordbrief op pagina 15 was niet goed geformuleerd, en wij zullen dit aanpassen en een referentie toevoegen. In sommige landen ligt de frequentie van obesitas rond de 50% of zelfs hoger (PMID: 23167948). Wereldwijd heeft ongeveer 30% van de populatie overgewicht en 10% obesitas (PMID: 23167948). Obesitas/overgewicht en vele obesitas gerelateerde comorbiditeiten (hypertensie, hypercholesteremie, diabetes, inflammatie etc.) zijn betrokken bij de ontwikkeling van cardiovasculaire ziekten en verhogen de kans op een herseninfarct (PMID: 30003901). Daarom is het voor deze studie belangrijk een model te gebruiken dat de ingewikkelde combinatie van factoren zo goed mogelijk nabootst. Ons onderzoek heeft een groot translationeel belang, want therapieën op maat zijn essentieel om obesitas en obesitas gerelateerde ziektes (zoals stroke) te kunnen behandelen.

- De doelstelling van uw project is tweeledig: U wilt het effect van inspanning onderzoeken op het herstel na een herseninfarct in obese muizen en u wilt de relatie tussen ernstig overgewicht en de pathologie van een herseninfarct en de mechanismen die in het brein plaatsvinden bestuderen. In tegenstelling tot uw vorige versie van dit onderzoek stelt u nu de effecten van inspanning op het herstel na een herseninfarct centraal in uw onderzoek. U kiest daarbij voor een diermodel dat met een hoog vet dieet het beste model zou zijn voor obesitas (en de daarmee geassocieerde symptomen) bij de mens. U meent dat dit model daardoor ook een goed model kan zijn voor het bestuderen van een herseninfarct bij de obese mens. Ter illustratie verwijst u meerdere malen naar een studie waaruit blijkt dat in het door u gekozen diermodel verschillen bestaan tussen deze dieren met en zonder hoog vet dieet en ook dat de duur van het dieet van invloed is op de infarctgrootte na ischemie-reperfusie na een myocardinfarct. In hoeverre kan een myocardinfarct model vergeleken worden met een herseninfarct model? In uw onderzoek zult u uitsluitend gebruik maken van dieren die een lange periode met een hoog vet dieet zijn gevoed. Het is de commissie niet duidelijk waarom dit het beste model is om uw onderzoek in uit te voeren en hoe dit vertaald kan worden naar de situatie in de mens. Onder meer door deze eerdere studie met deze muizen, is het voor de commissie nog steeds niet duidelijk waarom er geen proeven worden gedaan met muizen zonder hoog vet dieet, vooral wanneer u de mechanismen bestudeert. Deze vraag is u reeds gesteld (zie vraag 14 van uw antwoordbrief), maar uw antwoord heeft de commissie niet kunnen overtuigen dat u met de huidige strategie conclusief mechanistisch onderzoek kunt doen.

Antwoord: De onderzoeksvraag over de effecten van lichamelijke inspanning op het herstel na een herseninfarct staat centraal en in alle documenten van de aanvraag hebben wij geprobeerd onze hoofdonderzoeksvraag nog duidelijker te maken (PP, DAP, NTS). In de eerste versie van de projectaanvraag hebben wij niet duidelijk genoeg benadrukt dat de behoefte aan alternatieve therapieën voor (obese) stroke patiënten een hoge wetenschappelijke en sociale relevantie heeft. Bij een herseneninfarct wordt acute behandeling met bloed verdunnende medicijnen toegepast die alleen effectief zijn als ze snel (binnen enkele uren) na het herseneninfarct toegediend worden (trombolysie) (PMID: 18815401). Ook werd

aangetoond dat deze medicijnen zelfs soms slechter werken in obese stroke patiënten (PMID: 22285386). Vaak beginnen patiënten na een stroke met een korte periode fysiotherapie voor revalidatie, maar op lange termijn worden ze niet verder begeleid om hun lifestyle blijvend te verbeteren door bijv. dieet en lichamelijke inspanning. Doordat effectieve therapieën ontbreken leidt stroke vaak tot langdurige invaliditeit (PMID: 18815401). Uit eerdere dierstudies blijkt dat lichamelijke inspanning positieve effecten heeft op het herstel na een stroke (PMID: 19729591, 27605568). Om de effectiviteit van lichamelijke inspanning in obese stroke dieren te testen, hebben wij voor een zeer translationeel diermodel gekozen (10.1 c en 10.2 g). Aanvullende informatie over het diermodel en waarom het uitermate goed vertaalbaar is naar de mens hebben wij toegevoegd bij punt 4 (pagina 6).

In dit project creëren wij een multifactoriële ziekte context met 10.1 c en 10.2 g dieren op HFD om het ziektebeeld van obesitas en stroke zo goed mogelijk vergelijkbaar te maken met de situatie in de mens. In de mens spelen er meerdere, overeenkomstige factoren een rol bij het ontstaan van een myocard- en herseninfarct. De exacte onderliggende mechanismen en het samenspel van alle factoren die een rol spelen bij het ontstaan van een infarct zijn nog niet volledig bekend. In de meeste gevallen ligt atherosclerose ten grondslag van een infarct (PMID: 30653442). Atherosclerose is een sluipend ziekte proces van vetophoping in de binnenkant van een slagader waardoor de elasticiteit van de wand minder wordt (PMID: 31339782). Atherosclerose begint met een vette aanslag (fatty streaks) die kunnen uitgroeien tot een ophoping van LDL cholesterol (plaques) dat door het bloed wordt aangevoerd (PMID: 31339782). Het verkrijgen van de ziekte is sterk afhankelijk van risicofactoren, zoals roken, hoge bloeddruk, hoge cholesterol, overgewicht/obesitas etc. Bij een infarct ontstaat vaak een bloedprop op een opengescheurde plaque (PMID: 31339782). In mensen ontstaan 50% van alle ischemische herseninfarcten door een afsluiting van de middelste hersenlagaders (MCA). Wij gaan in de 10.1 c en 10.2 g dieren een herseneninfarct in dezelfde hersengebieden induceren via een middel cerebral artery occlusion. Dit herseneninfarct model is daarom heel goed vergelijkbaar met de ziekteprocessen in de mens. Een bloedprop of losgeschoten plaque kan uiteindelijk de slagader volledig afsluiten; in geval van een myocard infarct de afsluiting van een kransslagader en de afsluiting van arteriën in de hersenen bij een herseneninfarct. Bij een myocardinfarct komen de onderliggende processen (atherosclerose) overeen met die van een herseneninfarct en een myocard infarct model heeft daardoor ook een verhoogde kans op spontane trombotische occlusies in het hersenen zoals Girod et. al. heeft laten zien (PMID: 10559025). Thrombi kunnen na een myocard infarct in het brein terecht komen en een herseneninfarct veroorzaken (PMID: 31339782). Om het ziektebeeld van een infarct op niveau van een diermodel te bestuderen is het belangrijk dat het vetmetabolisme van deze dieren op het vetmetabolisme van een atherosclerose risico patiënt lijkt (hoog LDL-cholesterol) en dat de dieren atherosclerose ontwikkelen (PMID: 8349823). In tegenstelling tot andere diermodellen (ob/ob, db/db, wildtype op HFD), hebben 10.1 c en 10.2 g muizen, net zoals mensen met overgewicht en obesitas, meer VLDL en LDL cholesterol dan HDL cholesterol in het bloed en ze ontwikkelen hypertriglyceridemie en atherosclerose (PMID: 8614828). Daarom voorzien 10.1 c en 10.2 g dieren op HFD in een optimaal model voor ons onderzoek naar stroke in obesitas.

Er zijn verschillende diermodellen van obesitas beschikbaar. Graag willen wij toelichten waarom 10.1 c en 10.2 g muizen op langdurig HFD een zeer geschikt translationeel model voor obesitas in mensen zijn. Wij hebben bewust voor 10.1 c en 10.2 g muizen gekozen, omdat dit diermodel vele overgewicht/obesitas gerelateerde symptomen tot expressie brengt. Alleen 10.1 c en 10.2 g dieren op hoog vet dieet ontwikkelen metabool syndroom en cardiovasculaire ziekten, zoals overgewicht, hypertensie, hypertriglyceridemie, hyperinsulinemie, inflammatie, steatose van de lever, human-like lipide profiel, en atherosclerose (10.1 c en 10.2 g). De ontwikkeling van cardiovasculaire risicofactoren in mensen met overgewicht/obesitas verhoogt de kans op een stroke en ze staan ook in verband met

veranderingen in het brein **10.1 c en 10.2 g** in onze eerdere publicaties hebben wij namelijk aangetoond dat in dit diersmodel de effecten van obesitas op de hersenen zichtbaar kunnen worden gemaakt en zelfs ook functionele veranderingen gerelateerd aan obesitas kunnen worden gemeten in de hersenen van dit model **10.1 c en 10.2 g**

10.1 c en 10.2 g In totaal zijn er drie hoofdredenen waarom wij **10.1 c en 10.2 g** willen gebruiken.

- (1) Uniek voor dit diersmodel zijn verschillende aspecten van het vetmetabolisme die vergelijkbaar zijn met de situatie in de mens. Hyperlipidemie is een van de belangrijkste gevolgen van overgewicht/obesitas in de mens wat het ontstaan van cardiovasculaire aandoeningen bevordert. De mens heeft meer LDL-cholesterol in de bloed in relatie met HDL cholesterol. Het vetmetabolisme in de meeste diersmodellen is heel anders en er is meer LDL cholesterol in het bloed van de dieren. In muizen (ob/ob, db/db, wildtype) wordt VLDL en LDL-cholesterol snel geklaard uit het bloed en daarom is de HDL concentratie hoger dan de LDL concentratie (**10.1 c en 10.2 g**). Verder ontwikkelen de meeste dieren door snelle klaring van LDL-cholesterol geen robuuste hypercholesteremie en daarom ook geen cardiovasculaire ziekten, zoals atherosclerose (**10.1 c en 10.2 g**). **10.1 c en 10.2 g** ontwikkelen op langdurige HFD wel hyperlipidemie met meer LDL-cholesterol in hun bloed, vergelijkbaar met de mens (**10.1 c en 10.2 g**). **10.1 c en 10.2 g**. In het voorgestelde experiment zullen we fysiologisch relevante concentraties van macronutriënten (vet, proteïne, koolhydraten) gebruiken en een cholesterol supplement is niet nodig. De meest diersmodellen die atherosclerose ontwikkelen hebben hoge, niet fysiologische cholesterol concentraties nodig.
- (2) Het is bekend dat overgewicht in de mens veroorzaakt wordt door een positieve energiebalans: een grotere energie-inname via de voeding dan energieverbruik. Dieet-geïnduceerde obesitas muismodellen, zoals **10.1 c en 10.2 g** dieren lijken daarom meer op de situatie in de mens, omdat ze alleen op langdurige HFD obesitas ontwikkelen. De HFD die wij in dit experiment gebruiken bevat een compositie van alle macronutriënten (vet, proteïne, kolhydraten) die ook terug te vinden is in de dieet van mensen (**10.1 c en 10.2 g**). De meeste dieet-geïnduceerde modellen van obesitas hebben suprafysiologische hoeveelheden van bijvoorbeeld vet nodig of vetten die mensen in deze hoeveelheden niet zullen eten. Wij gebruiken slechts 24% w/w (=45% energie uit vet) vet in onze studies (**10.1 c en 10.2 g**). In tegenstelling hiermee, ontwikkelen genetische geïnduceerde diersmodellen zoals ob/ob of db/db muizen obesitas zonder de invloed van (HFD) voeding. Deze klassieke diersmodellen representeren dus niet de ziekte mechanismen van mensen met overgewicht of obesitas (cardiovasculaire ziekten, zoals hyperlipidemie, atherosclerose). Bovendien is (langdurige) HFD geïnduceerd overgewicht in **10.1 c en 10.2 g** muizen een gematigd diersmodel van obesitas, vergeleken met klassieke obesitas diersmodellen (ob/ob; db/db). Ob/ob en db/db muizen hopen onmiddellijk na de geboorte snel veel vet op en vertonen veel inflammatie zonder een hoog vet dieet en representeren niet de processen in humane obesitas en overgewicht (**10.1 c en 10.2 g**).
- (3) Met behulp van een genexpressieprofiel analyse werd de expressie van genen van **10.1 c en 10.2 g** op HFD vergeleken met de mens om de translationele waarde van het diersmodel te bestuderen. Teufel et al. heeft aangetoond dat genexpressie in de meest muismodellen vaak niet overeenkomt met de mens (**10.1 c en 10.2 g**). Echter bleek in een recente studie dat de genexpressie van **10.1 c en 10.2 g** wel te vergelijken is met de situatie in de mens **10.1 c en 10.2 g**. Niet alleen genen overlappen, maar ook gehele pathways en upstream regulatoren (receptor signaling) zijn vergelijkbaar tussen muis **10.1 c en 10.2 g** en mens **10.1 c en 10.2 g**.

Wij induceren een experimenteel herseninfarct in de muizen via een middle cerebral artery occlusion (MCAO). Deze techniek veroorzaakt een hypoperfusie (30min) in het gebied van de middelste hersenslagaders (MCA). Bijna 50% van alle ischemic stroke patiënten hebben een herseninfarct in dit gebied (10.1 c en 10.2 g). Daarom is deze techniek goed vertaalbaar naar mensen met een stroke. Wij werken samen met bekende onderzoekers in het veld van klinische stroke/obesitas studies en zelf hebben wij al meerder studies gepubliceerd waarin dezelfde diermodellen en technieken werden gebruikt (10.1 c en 10.2 g

Deze studies laten ook zien dat alle diermodellen (bijv. 10.1 c en 10.2 g) en alle gebruikte en gevalideerde technieken (bijv. tMCAO) geschikt zijn om translationeel onderzoek naar obesitas en herseninfarcten te doen (10.1 c en 10.2 g). Met ons longitudinale en translationele studieontwerp zal onderzocht worden op welke ziekte mechanismen vrijwillige beweging na een stroke in obese dieren kan ingrijpen (bijv. op inflammatie, doorbloeding van het hersenen, structurele veranderingen van het brein). Uiteindelijk kan ons onderzoek helpen de ontwikkeling van gepersonaliseerde therapieën te bevorderen. Meer uitleg over het diermodel, de stroke operaties en de translationele waarde van de studie hebben wij toegevoegd aan de aanvraag. In de projectaanvraag hebben wij de keuze en de vertaalbaarheid van het diermodel en alle technieken uitgebreid uitgelegd.

Wij willen graag de studieopzet verder toelichten en uitleggen waarom wij geen dieren zonder hoog vet dieet in de studie willen meenemen. Het hoofddoel van dit onderzoek is het bestuderen van het effect van lichamelijke inspanning op het herstel na een stroke in obese dieren (10.1 c en 10.2 g

[REDACTED]

[REDACTED]. Verder kunnen wij voor de analyses van MRI scans en het post-mortem brein weefsel altijd de aangedane rechterhersen helft (stroke) vergelijken met de linkerhersen helft (controle).

Het is in dit experiment juist niet ons doel de invloed van stroke of/en beweging tussen obese en niet-obese dieren te vergelijken. In eerdere studies werden de effecten van een stroke in obesitas vs niet-obesitas dieren al gedetailleerd onderzocht. Haley et al. heeft al deze studie resultaten in een review bediscussieerd (PMID: 27655337). Het implementeren van tweemaal zo veel dieren zou daarom niet gerechtvaardigd zijn naar onze mening, ook omdat deze dieren niet nodig zijn om onze hoofdonderzoeksvraag te beantwoorden. Bovendien is het mogelijk, behalve onze hoofdonderzoeksvraag, ook nog andere onderliggende pathologische mechanismen in obese dieren te bestuderen (analyses over de tijd heen: baseline vs vervolgmetingen). Daarom zijn wij ervan overtuigd dat de uitkomst uit deze studie zal opwegen tegen het ernstige ongerief van de dieren.

- Vooral omdat alle dieren ernstig ongerief zullen ondervinden dient heel duidelijk te zijn wat de opbrengsten van deze studie zullen zijn om het belang van het onderzoek te kunnen afwegen. U noemt dit project zuiver translationeel/toegepast onderzoek. De commissie moet dan wel helder geschetst krijgen hoe haalbaar de uiteindelijke doelen zijn en wat de opbrengst precies zou kunnen zijn. Gaat het vooral om de effecten van inspanning op het herstel van een beroerte in obese patiënten?

*Antwoord: Wij willen nog een keer benadrukken dat het belangrijkste doel van deze studie is om de effecten van lichamelijke inspanning als therapie na een stroke te onderzoeken (zie vraag 1). In de nieuwe versie van ons projectaanvraag hebben we geprobeerd dit nog duidelijker te maken. Ons onderzoek heeft een hoge sociaal en wetenschappelijke waarde, want er zijn nog geen effectieve therapieën voor de miljoenen mensen die aan de gevolgen van stroke leiden. In klinische studies is het vaak niet mogelijk gedrag, cognitie, neurologische gebreken in combinatie met immunohistochemische en biochemische analyse van het post-mortem brein weefsel te bestuderen. Door de combinatie van verschillende technieken (gedrag, MRI, post-mortem analyse) en door het longitudinale studieontwerp zullen wij met onze studie inzicht krijgen of beweging na een stroke het herstel (van het brein) kan bevorderen en via welke mechanismen/fysiologische processen. Wij gaan in alle dieren naast fysiologische parameters (bloeddruk, bloedsuiker, eetgedrag, feces), functie en structuur van het hersenen (MRI, PLI, kleuringen, biochemie), maar ook cognitie en gedrag meten en al deze parameters over de tijd heen bestuderen. Deze kennis kan helpen de ontwikkeling van additionele therapieën gericht op de betrokken mechanismen in combinatie met lichamelijke inspanning op maat in de mens bevorderen. In samenwerking met **Utrecht** en de afdeling **10.2.g**) hebben wij de intentie in toekomst een klinische studie op te zetten om therapieën met dieet en exercise te testen. Voor deze toekomstige klinische studies zullen onze studieresultaten met name onze MRI bevindingen maar ook de gevonden pathologische mechanismen heel erg het studiedesign van dergelijke studies optimaliseren.*

- U voegt nu experimenten toe om het belang van het microbiom in de darm en de mogelijke invloed van veranderingen in de darm bij obesitas te bestuderen. Het is de commissie echter niet duidelijk hoe u de samenstelling van het microbiom, afkomstig van feces en rectale swaps, wilt correleren aan de andere parameters in het onderzoek.

Antwoord: 10.1 c en 10.2 g

. In eerdere studies en ook in hetzelfde diermodel hebben wij microbiom analyses gedaan en daarom zijn wij bekend met deze data analyse (10.1 c en 10.2 g). De studiedesign en de research strategie voor de analyse van het microbiom en andere parameters hebben wij gedetailleerd in het PP beschreven (zie ook vraag 5).

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

- Het is onduidelijk hoeveel training/beweging de dieren krijgen die een loopwiel in hun kooi krijgen. Zal dit gekwantificeerd worden? Dit lijkt de commissie een belangrijk aspect, omdat als u adviezen wilt geven aan (obese) mensen na een herseninfarct, er toch een indruk moeten zijn hoeveel training noodzakelijk is.

Antwoord: **10.1 c en 10.2 g**) gehuisvest worden waarin de activiteit, loopgedrag en looppatroon van elke muis gemonitord wordt via sensors in de bodem van de kooi. **10.1 c en 10.2 g**

10.1 c en 10.2 g. Dit is een zeer relevante en objectieve manier om het herstel na een stroke te meten zonder dat de dieren ongerief ondervinden door dit te moeten meten in andere opstellingen buiten hun home cage (bijv. cat walks). Ook de hoeveelheid activiteit van de dieren in het loopwiel kunnen wij 24/7 meten en kwantificeren zonder de dieren uit hun thuishok te verplaatsen (afstand, rotaties). Op deze manier kunnen wij de hoeveelheid training correleren aan verschillende parameters (bijv. inflammatie, doorbloeding van het hersenen, cognitie, etc.). Deze informatie is terug te vinden in alle onderdelen van de aanvraag.

-Het ongerief en de uitval, met name door de inductie van een herseninfarct en dermatitis, wordt hoog ingeschat. De commissie vraagt zich af of er maatregelen genomen kunnen worden om het ongerief zoveel mogelijk te beperken. Kunt u bijvoorbeeld door tijdig dieren uit de proef te nemen het ongerief beperken?

Antwoord: Wij proberen het ongerief in dit experiment zo laag mogelijk te houden. De dieren worden uit de onderzoek gehaald als zij een humaan eindpunt bereiken om onnodig ongerief te voorkomen. Wij verwachten alleen binnen de eerste dagen na de tMCAO inductie ernstig ongerief, omdat de dieren van de operatie moeten herstellen en acute stroke symptomen (bijv. motorische beperkingen, gewichtsverlies, etc.) laten zien. Deze complexe combinatie van symptomen behoort tot het ziektebeeld van een stroke en daarom kunnen wij deze symptomen niet verminderen. Ook in de IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments) **10.1 c en 10.2 g**) worden de verschillende symptomen van een stroke beschreven. Op dag vier na de stroke inductie beginnen de dieren zelfs vrijwillig in het loopwiel te lopen en hun activiteit in de kooi gaat omhoog. Dit laat zien dat ze vrij snel van de herseneninfarct herstellen en op korte termijn na de operatie alleen matige neurologische klachten tot expressie brengen. Tijdens het induceren van de stroke zijn de muizen onder narcose en na de operatie krijgen alle dieren pijnstillende middelen. Verder worden tijdens nauwgezette controles fysiologische parameters, voedsel/water consumptie, grimace scale en de neurologische score voor elk dier bepaald om de mate van ongerief te beoordelen. Ook het monitoren van de activiteit in **10.1 c en 10.2 g** helpt om abnormaal gedrag en ongerief vroegtijdig te detecteren. In een tabel in de DAP en in de powerberekening hebben wij het verwachte sterftecijfer in dit experiment aangegeven (door dermatitis, herseninfarct). Verder hebben wij ook aangegeven hoe wij het ongerief van de dieren, vooral na de stroke inductie, zo goed mogelijk zullen beperken.

- De solitaire huisvesting is langdurig. Kunt u aangeven of u daarvoor verlichtende maatregelen kunt nemen? U kunt dit overleggen met de IvD.

Antwoord: In overleg met de IvD hebben wij besloten dat het niet mogelijk is om de solitaire huisvesting na de stroke inductie in te korten. De DEC commissie heeft al onder punt 4 aangegeven dat het een belangrijke punt is om de hoeveel beweging de dieren in het loopwiel in hun kooi te kwantificeren. Een belangrijk argument om de dieren individueel te huisvesten is dat wij op deze manier voor elke muis precies kunnen meten, hoeveel en hoelang ze gebruik maken van het loopwiel. Met de **10.1 c en 10.2 g** kunnen wij 24/7 (elke 1/4 seconde) het loopgedrag in de loopwielen meten. Verder zullen wij 24/7 de activiteit monitoren **10.1 c en 10.2 g**) en verschillende fysiologische parameters (bijv. hypo- of hyperactiviteit) van de dieren meten om mogelijk abnormaal gedrag vroegtijdig te detecteren. Het is niet mogelijk dividers in de kooien te plaatsen voor meer contact tussen de dieren. **10.1 c en 10.2 g** worden individueel geventileerd en er mogen geen gaatjes in de kooi zijn. Verder kan alleen een

loopwiel per kooi geplaatst worden en in combinatie met een divider zal alleen een muis toegang hebben tot het loopwiel. Echter kunnen de dieren wel elkaar zien en ook horen (ultrasound) omdat de kooien naast elkaar in een rek staan. Wij zullen in deze studie ook de voedselinname en water consumptie per dag/per individueel muis meten. Vooral de hoeveelheid HFD (calorieën) is belangrijk en kan gecorreleerd worden aan alle andere gemeten parameters om te kijken of dit een invloed heeft. Bovendien kunnen wij op deze manier beter de humane eindpunten voor elk dier bepalen. Verder hebben wij in eerdere studies gezien dat net geopereerde muizen aan elkaars hechtingen gaan knagen en mannetjes vechtgedrag kunnen vertonen. Het is niet mogelijk de mannetjes op een later tijdstip terug te zetten, omdat ervaring heeft geleerd dat ze doorgingen met vechten. Vechten gebeurt minder vaak bij vrouwtjes muizen, maar aangezien het experiment voor mannen en vrouwen gelijk gehouden moet worden zullen ook de vrouwen solitair gehuisvest worden. Wij hebben deze beredenering aan onze projectaanvraag toegevoegd.

- De humane eindpunten die u in het aangepaste projectvoorstel geeft komen niet overeen met de punten die u noemt op pagina 21 in uw antwoordbrief. Mogelijk is e.e.a. niet goed overgenomen in de aanvraag. De figuur is niet compleet en in feite ook niet van toepassing (60 i.p.v. 30 min MCAO) en de tekst die onder deze figuur staat in de antwoordbrief ontbreekt in de aanvraag. De tabel met criteria die u in de vorige versie van de aanvraag noemt is verdwenen. U gaat voorbij aan de eventuele late effecten (dit zijn langdurige proeven) die na een herseninfarct kunnen optreden.

Antwoord: Wij hebben het figuur uit de aanvraag verwijderd. Wij zijn het ermee eens dat de figuur niet van toepassing is. Verder hebben wij in de recente versie van onze aanvraag alle veranderingen/aanvullingen in rood aangegeven en oude formuleringen die niet meer relevant zijn doorgehaald. Op deze manier zijn de veranderingen hopelijk beter te lezen en te begrijpen. Wij hebben nu ook de humane eindpunten vanaf 1 week na operatie toegevoegd.

Niet-technische samenvatting:

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

Antwoord: Wij hebben alle belangrijke veranderingen in de DAP en het PP ook in de NTS aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag richt zich op effecten van lichaamsbeweging na een herseninfarct. Mensen met ernstig overgewicht (obesitas) hebben een grotere kans op het krijgen van een herseninfarct,

onder meer omdat obesitas een belangrijke risicofactor vormt voor een herseninfarct. Het is nog niet duidelijk of obese mensen slechter herstellen van een herseninfarct. Het is bekend dat lichaamsbeweging de negatieve metabole effecten van obesitas bij muizen en mensen kan verminderen, en dat het bij mensen kan leiden tot verbeterde hersendoorbloeding en na een herseninfarct kan leiden tot een betere connectiviteit tussen de hersenhelften. De onderzoekers willen een muismodel voor obesitas gebruiken om de effecten van lichaamsbeweging na een herseninfarct te onderzoeken. De onderzoekers willen, met behulp van MRI en gedragstesten, meten of hersenconnectiviteit, -doorbloeding, motorisch functioneren en cognitie verbeteren wanneer de obese dieren extra lichaamsbeweging krijgen tijdens het herstel van een herseninfarct (tot 5 maanden na het infarct). Ook worden algemene fysiologische parameters gemeten, zoals gewicht, voedsel- en waterinname, bloeddruk, neurologische score en pijnscore, worden markers voor metabole gezondheid in het bloed bepaald, en wordt de samenstelling van het microbioom geanalyseerd. De obese dieren zijn vrij om al dan niet gebruik te maken van het loopwiel in hun kooi, maar in de helft van de kooien is dat wiel geblokkeerd. Door deze opzet zal er mogelijk veel variatie zijn in de belangrijkste experimentele variabele (verschillen in mate van lichaamsbeweging in de groep die kan rennen in het loopwiel), waardoor mogelijk geen betrouwbare uitspraak gedaan kan worden over het effect daarvan.

De onderzoekers vermelden dat zij ook mechanistisch onderzoek zullen doen om te achterhalen of obesitas leidt tot veranderingen in de pathologie van herseninfarcten en in de gevolgen van een infarct op hersenfunctie en -structuren, en welke mechanismen daarbij een rol spelen. De commissie heeft de onderzoeker gevraagd toe te lichten waarom zij denkt dit conclusief te kunnen onderzoeken zonder onderzoek aan niet-obese dieren van dezelfde stam. Het antwoord van de onderzoeker heeft de commissie niet kunnen overtuigen. Er is weliswaar al veel onderzoek gedaan naar de effecten van herseninfarct in obese vs niet-obese dieren (zoals gepresenteerd in het review van Haley waar de onderzoekers naar verwijzen), maar niet met deze specifieke muizenstam **10.1 c en 10.2 g** die de situatie bij mensen volgens de onderzoekers zoveel beter weerspiegelt. Ook wijkt het design van de in deze aanvraag beschreven studie af van de aangehaalde studie (de onderzoeker zal meer en andere metingen doen aan obese Idr -/- dieren), waardoor de eerder verkregen resultaten met niet-obese dieren van andere muizenstammen naar de mening van de commissie niet kunnen fungeren als vergelijkingsmateriaal. Het effect van obesitas op pathologie en gevolgen van een herseninfarct en de mechanismen die daaraan ten grondslag kan met de voorgestelde experimenten naar de mening van de commissie daarom niet goed onderzocht worden.

De commissie constateert dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De onderzoekers zullen de procedure voor het aanbrengen van het herseninfarct (tijdelijke afsluiting van een arterie in de hersenen) oefenen op 15 obese dieren, zodat er voldoende ervaring is opgedaan met deze operatie bij deze muizenstam en ook duidelijk is hoe deze dieren het best gehandeld kunnen worden na die operatie en bij de MRI-scans onder anesthesie. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is tweeledig: 1) te onderzoeken wat het korte- en langetermijn effect is van lichaamsbeweging op obese muizen die herstellen van een herseninfarct, en 2) onderzoeken of obesitas leidt tot veranderingen in de pathologie van herseninfarcten en in de gevolgen van een infarct op hersenfunctie en -structuren, en welke mechanismen daarbij een rol spelen. Het uiteindelijke doel is bij te dragen aan effectiever herstel van obese mensen na een herseninfarct. De onderzoekers gebruiken een muismodel voor obesitas dat veel overeenkomsten vertoont met mensen met obesitas. Het tijdelijk verminderen van de bloedtoevoer naar de hersenen bij deze dieren leidt tot hersenschade die in grote lijnen overeenkomt met de schade die ontstaat door een herseninfarct bij mensen. Desondanks herstellen de dieren veel sneller en zonder de complicaties die vaak bij mensen worden gezien (depressie, epilepsie). In het review waarnaar de onderzoeker verwijst (van Clemens Sommer, in *Acta Neuropathol.* 2017) wordt vermeld dat anesthesie ten tijde van het herseninfarct mogelijk een beschermende rol speelt, en dat het in deze aanvraag beschreven occlusiemodel vooral een goed model is voor mechanische trombolysen als behandeling van een herseninfarct. De langdurige individuele huisvesting van de muizen wijkt sterk af van de natuurlijke situatie en behoefte van de dieren, hetgeen mogelijk van invloed is op de vertaalbaarheid van de resultaten van deze studie. De commissie is daarom van mening dat de resultaten van deze experimenten, waarin met name het herstel na een herseninfarct centraal staat, beperkte translationele waarde hebben. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van het effect van lichaamsbeweging op herstel van een herseninfarct bij obese muizen nog zeer beperkt is, en dat zij van mening is dat deze kennis kan leiden tot verbetering van het behandelresultaat bij obese patiënten die een herseninfarct hebben doorgemaakt. In de huidige behandelrichtlijn voor CVA is echter al veel aandacht voor lichaamsbeweging / fysiotherapie in de herstelfase. Ook wordt mensen met obesitas, die last hebben van aan de ziekte gerelateerde symptomen, geadviseerd om af te vallen en meer te bewegen, aangezien op die manier de oorzaak van de problemen wordt aangepakt. Naar de mening van de DEC is het uiteindelijke doel van deze aanvraag daarom van beperkt belang.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun integriteit en welzijn in grote mate worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor mensen met obesitas is dit onderzoek van beperkt belang, omdat het kan leiden tot extra onderbouwing van de huidige adviezen voor het bevorderen van het herstel na een herseninfarct en het verminderen van obesitas.
In de huidige vorm zal het onderzoek in beperkte mate bijdragen aan de al bestaande kennis over het effect van lichaamsbeweging op herstel na een herseninfarct van obese **10.1 c en 10.2 g** muizen.

6. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met het aanbrengen van herseninfarcten in verschillende muismodellen. Het onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn helder verwoord, maar de commissie is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters hier niet volledig logisch bij aansluiten (zie C1 en C4). De DEC is dan ook van mening dat het project niet goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak niet kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I 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)
10. In de aanvraag wordt afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. Zij worden gedurende lange tijd (tot 30 weken) individueel gehuisvest in dichte **10.1 c en 10.2 g** n zonder gaatjes, waardoor zij elkaar ook niet kunnen ruiken of horen. De commissie heeft zich niet tot in detail verdiept in de noodzaak van juist deze vorm van huisvesting en verzorging van de dieren voor het behalen van de doelstelling van het onderzoek.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd als ernstig voor alle dieren. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door een operatie onder anesthesie waarin de middelste cerebrale arterie aan één zijde gedurende een half uur wordt afgesloten (of een operatie zonder occlusie), en de gevolgen daarvan voor de dieren. Daarna worden zij gedurende lange tijd individueel gehuisvest waarbij zij elkaar ook niet kunnen ruiken of horen, worden zij enkele malen onder anesthesie gebracht voor een MRIsan van de hersenen, wordt er meerdere keren bloed afgenomen en de bloeddruk gemeten, en ondergaan zij meerdere gedragstesten. Het cumulatief ongerief is daarom terecht ingeschat als ernstig voor alle dieren.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat

inherent is aan het doen van dierproeven. Bij de helft van de dieren wordt een kunstmatig herseninfarct aangebracht, waardoor zij ernstige neurologische verschijnselen vertonen die normaal functioneren in de weg staan.

13. De commissie heeft de onderzoeker gevraagd of zij humane eindpunten kan formuleren waardoor het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk beperkt kan worden. Zij neemt aan dat de onderzoeker dit in afdoende mate heeft gedaan, maar heeft dit onderdeel van de aanvraag niet tot in detail opnieuw beoordeeld. Op basis van de inschatting van het belang van deze aanvraag en de inschatting van het ongerief voor de dieren dat daar tegenover staat, kwam de commissie al tot een ethische afweging die negatief uitviel.

3V's

14. De aanvrager meent dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Om het effect van lichaamsbeweging op herstel na een herseninfarct te kunnen meten zijn intacte organismen nodig. Aangezien het translationeel onderzoek betreft is het daarbij van belang dat een diermodel wordt gekozen dat voldoende overeenkomsten vertoont met mensen qua hersenstructuur en -functie, gedrag en cognitie. De commissie is van mening dat de vraag of lichaamsbeweging een positief effect heeft op het herstel na een herseninfarct bij mensen met obesitas het best bij die patiëntengroep onderzocht kan worden. Het merendeel van de in de dierproeven voorgestelde analyses (MRI-metingen, bloed(druk)onderzoek, microbioomanalyse, gedragsonderzoek inclusief cognitie) kan ook bij mensen plaatsvinden. De analyse van hersenweefsel lijkt een ondergeschikte rol te spelen in het onderzoek: dit wordt niet benoemd bij de relevante uitkomstparameters in de bijlage waarin de dierproeven worden beschreven en slechts summier vermeld bij de beschrijving van het onderzoek waardoor niet duidelijk wordt welke specifieke onderzoeksdoelen dit dient.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is gebaseerd op de vergelijking van obese dieren die al dan niet een herseninfarct doormaken en daarna al dan niet extra lichaamsbeweging kunnen krijgen via een loopwiel in hun kooi. Deze opzet is naar de mening van de commissie niet afdoende om mechanistisch inzicht te verkrijgen. Voor het beantwoorden van de translationele onderzoeksvraag (hebben obese herseninfarct patiënten baat bij lichaamsbeweging) zouden waarschijnlijk slechts twee groepen nodig zijn: obese dieren die een herseninfarct krijgen en daarna ofwel géén extra lichaamsbeweging, of wél extra lichaamsbeweging. Daarbij wil de commissie opmerken dat de gekozen proefopzet voor vrijwillige lichaamsbeweging in een loopwiel waarschijnlijk leidt tot grote variatie in lichaamsbeweging en bovendien langdurige individuele huisvesting noodzakelijk maakt. Andere vormen van lichaamsbeweging zouden mogelijk beter controleerbaar zijn en ook de situatie bij mensen beter kunnen weerspiegelen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Het veroorzaken van een herseninfarct gaat onvermijdelijk gepaard met veel ongerief voor de dieren. Door de gekozen proefopzet kan het ongerief van de individuele huisvesting niet verzacht worden. De DEC is echter wel van mening dat mogelijk niet alle denkbare alternatieven voor lichaamsbeweging, die minder ongerief voor de dieren opleveren en mogelijk ook beter aansluiten bij de situatie van herseninfarctpatiënten, in overweging zijn genomen.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden. De onderzoeker start met onderzoek met mannelijke dieren, en zal alleen bij waargenomen effecten van vrijwillige lichaamsbeweging hetzelfde onderzoek bij vrouwelijke dieren uitvoeren.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. De commissie is van mening dat de onderzoeksvragen die beantwoord kunnen worden door de post-mortem analyse niet erg helder zijn gepresenteerd, waardoor de bijdrage van dit onderzoek voor het behalen van de doelstelling niet goed is in te schatten.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van 1) te onderzoeken wat het korte- en langetermijn effect is van lichaamsbeweging op obese muizen die herstellen van een herseninfarct, en 2) het beantwoorden van de vraag of obesitas leidt tot veranderingen in de pathologie van herseninfarcten en in de gevolgen van een infarct op hersenfunctie en -structuren, en welke mechanismen daarbij een rol spelen, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een ernstige aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De commissie is er niet van overtuigd dat doelstelling 2 met de voorgestelde experimenten kan worden behaald. Doelstelling 1 wordt onderzocht om uitspraken te kunnen doen voor obese herseninfarct patiënten. De commissie is van mening dat het onderzoek waarschijnlijk beter bij deze doelgroep uitgevoerd zou kunnen worden, omdat vrijwel alle beschreven parameters bij mensen gemeten kunnen worden en zij betwijfelt of de resultaten behaald met het muismodel eenvoudig vertaald kunnen worden naar mensen (beschreven in C4 tot C20).

Voor obese patiënten is dit onderzoek van beperkt belang, omdat het kan bijdragen aan een betere onderbouwing van het huidige beweegadvies voor mensen met obesitas en in de CVA-richtlijn. De DEC kent daar niet veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Veel proefdieronderzoek heeft al aangetoond dat beweging een positieve invloed heeft op negatieve gezondheidssymptomen die gepaard gaan met obesitas (zoals hoge bloeddruk, metabool syndroom, leververvetting). Ook is bij proefdieren al aangetoond dat beweging na een herseninfarct helpt om beter te herstellen (minder ontsteking, kleiner aangedaan gebied en minder oxidatieve stress). Het is al duidelijk dat meer lichaamsbeweging bij obese mensen een gunstige uitwerking heeft op allerlei gezondheidsparameters, waardoor het aannemelijk is dat dit ook een gunstig effect zal hebben op het herstel na een herseninfarct. De huidige richtlijn voor CVA-patiënten bevat al het advies om meer te bewegen. De commissie verwacht daarom niet dat dit onderzoek iets zal veranderen aan die richtlijn. Voorts zal het voorgestelde onderzoek in beperkte mate bijdragen aan kennis van de mechanismen die een rol spelen bij schade aan

hersenen en verlies van hersenfunctie door een herseninfarct in combinatie met obesitas, waardoor het volgens de commissie niet aannemelijk is dat dit onderzoek direct zal bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën.

3. De DEC onderkent het belang van de doelstellingen: 1) te onderzoeken wat het korte- en langetermijn effect is van lichaamsbeweging op obese muizen die herstellen van een herseninfarct, en 2) of obesitas leidt tot veranderingen in de pathologie van herseninfarcten en in de gevolgen van een infarct op hersenfunctie en -structuren, en welke mechanismen daarbij een rol spelen. Zij is daarbij van mening dat het beschreven onderzoek niet afdoende is om de tweede doelstelling te behalen. Voor relevant mechanistisch onderzoek is het naar de mening van de DEC noodzakelijk om ook een niet-obese controlegroep te onderzoeken, met name omdat onderzoek naar de invloed van obesitas op een herseninfarct bij mensen geen eenduidige resultaten heeft opgeleverd. Het onderzoek zou daarmee ook relevant kunnen worden voor niet-obese patiënten.

Wat betreft de eerste doelstelling ziet de commissie meerdere kwesties die de directe vertaalbaarheid van de resultaten naar de klinische praktijk vertroebelen. De commissie kan niet goed navolgen of dit de goede experimenten zijn voor het behalen van die doelstelling. Na afloop van de dierproef worden hersenen, lever en vet uitgenomen voor analyse, maar onduidelijk blijft wat hier precies in wordt onderzocht en hoe de resultaten bijdragen aan het behalen van de doelstelling. Het overgrote deel van het onderzoek (MRI-scans, bloedonderzoek, fecesonderzoek, motorisch en cognitief onderzoek) zou relatief eenvoudig bij de doelgroep (obese herseninfarct patiënten) als onderdeel van de behandeling en begeleiding uitgevoerd kunnen worden. De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, per saldo niet rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is niet voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- X De volgende doorslaggevende ethische bezwaren: de commissie is weliswaar overtuigd van het belang van onderzoek naar betere therapieën voor mensen die een herseninfarct hebben doorgemaakt, maar is van mening dat de resultaten van dit onderzoek niet substantieel bijdragen aan dat uiteindelijke doel. Zij vindt daarom dat dit onderzoek niet opweegt tegen het ernstige ongerief voor de muizen.
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.

Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10300
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
- 1.3 Provide the title of the project. Effect of voluntary exercise on recovery after an ischemic stroke in high-fat diet induced obese **10.1** **gen** **10.2** **g** mice

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Obesity (body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m²) is a major public health burden in most developed countries because of its strong association with metabolic and cardiovascular diseases [1]. The most common cause of weight gain leading to obesity is a sedentary life style in combination with a western diet [2]. In 2015, the WHO estimated that worldwide 2.3 billion (31,3%) adults were overweight from which more than 700 million (9,6%) were obese [3]. Obesity has been classified as a worldwide epidemic since the prevalence doubled in the last decade [4]. In some countries the frequency of obesity has reached 50% or higher [4]. In the Netherlands 48% of the population is overweight of which 11% are obese [5]. Meta-analysis have shown that obese individuals have a 64% greater probability of getting ischemic stroke compared with normal weight subjects, regardless of the gender and ethnicity [6]. In detail, each unit increase of BMI is associated with a significant 6% increase in the risk of ischemic stroke [7]. Obesity is therefore also strongly correlated with the development of stroke-related risk factors, including hypertension, diabetes and hyperlipidemia [6]. However, obesity still seems to be an independent risk factor for stroke, even after correcting for confounding factors such as age, lifestyle, and cardiovascular risk factors [6].

The clinical outcome after an ischemic stroke is often severe, since stroke survivors suffer from gradual, but continuous cognitive and behavioral dysfunction and long-term disability [8, 9]. This is These adverse effects of stroke are a consequence of irreversible cerebral damage in the core region of the ischemic stroke. Nevertheless, in the peripheral zones (penumbra) around the ischemic core damaged tissue has the potential to recover and is a target of possible treatment approaches [10, 11]. Moreover, obesity itself is associated with structural brain changes, and development of cognitive impairments which can lead to Alzheimer's disease, suggesting that the interaction of both diseases might lead to even more aggravated outcomes [12, 13]. Among the first-ever stroke patients, 35,5% are classified as clinically obese. Therefore effective treatment strategies are needed [14].

Although obesity is a well-established risk factor for stroke, there are contradictory results regarding the influence of overweight on the clinical outcomes in stroke survivors. Several Some clinical studies indicate that increased BMI predicts a reduced mortality and morbidity after stroke (obesity paradox), while other papers do not find increased survival among obese stroke survivors [3, 15]. Importantly, clinical studies only investigated the association of morbidity/mortality and obesity, while the underlying mechanisms explaining whether and how obesity affects stroke have not been investigated yet. Hence, animal studies are required to study the exact biological pathways linking obesity and stroke to pathological processes in the brain. In-depth knowledge about the intertwining pathologies of stroke and obesity in animal models will help us to develop translational and personalized treatment strategies for obese stroke survivors.

Animal studies have shown that experimental stroke in genetic or diet induced models of obesity leads to deteriorated ischemic damage [16]. In addition, the few performed preclinical studies reported bigger infarct sizes, more severe brain edema, increased blood-brain barrier permeability, exaggerated inflammatory response and an enhanced microvascular damage in obese rodents following stroke [17]. No studies are available that have investigated the cerebral (functional) connectivity or cerebral blood flow of obese rodents after an ischemic stroke. It also remains unknown to which extend brain recovery in obese stroke mice is possible on long-term poststroke, since most studies investigating stroke or stroke in combination with obesity are of short nature. Furthermore, little research has been performed on cognitive, motor and behavioral impairments correlate with the severity of ischemic brain damage after stroke in obese animals. Importantly, because of this knowledge gap, tailor-made treatment approaches, for obese stroke patients in particular, are lacking and have also not been studied in animal models yet.

At present, state-of-the-art stroke treatments include thrombolytic therapy and thrombectomy to dissolve or remove a blood clot from the blood vessel, but the efficacy of these therapies is highly dependent on the time window of administration [9]. Furthermore thrombolysis after stroke was shown to have a reduced efficacy in obese patients, increasing the need to find alternative treatments approaches [18]. Up to now, treatments in the field of ischemic stroke were mainly focusing on motor recovery, where a number of

patients show partial recovery indicating the brain's capacity for repair, or compensation after injury [19, 20]. Motor impairments following a stroke are often tackled by physiotherapy with minor recovery, and mostly no repair of the damaged brain networks. Hence, translational animal models are needed to further elucidate the interaction of pathologies and to test novel treatment approaches. In the last decade, clinical trials and animal studies have demonstrated that exercise can positively modify cerebral vasculature, including the regulation of cerebral blood flow [21], vascular related factors as well as inflammation and neurogenesis [22]. Greater daily physical activity was also associated with increased interhemispheric connectivity [23]. After an ischemic stroke in rodents, exercise was also shown to reduce inflammation, lesion size and oxidative stress, leading to improved cognition [17]. Next to studying the effect of exercise in stroke, exercise has also been investigated in obese mice focusing mainly on the metabolic effects. These studies have shown that exercise promotes weight loss, prevents fat accumulation in the liver, attenuates adipose tissue inflammation, and improves obesity-related biomarkers, such as blood glucose, adipokines, and insulin. Only one study, performed by Graham and colleagues, has shown that voluntary exercise prevents obesity-induced cognitive decline and white matter damage in mice [24]. Nevertheless, none of the mentioned studies investigated voluntary exercise as a therapeutic approach after an ischemic stroke in obese mice specifically. Thus, our main research focus is to investigate the effectiveness of voluntary exercise on brain recovery in a animals model of obesity after an ischemic stroke.

These findings motivate us to investigate the effect of voluntary exercise on cognition, structural and functional cerebral connectivity, and cerebral blood flow in an HFD-induced mouse model of obesity after an ischemic stroke following a longitudinal study paradigm. Until now, voluntary exercise was only tested as a treatment for obesity or stroke, but never in combination of both pathologies. For the first time, we will model an ischemic stroke in [10.1 c en 10.2 g](#) mice which mimics human obesity features most optimal. This well studied murine model has adiposity mimicking features when exposed to a diet containing high levels of fat and/or sucrose. Secondly, [10.1 c en 10.2 g](#) mice develop features of cardiovascular risk factors and metabolic syndrome, including hypertension, high blood sugar, excess body fat around the waist, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, and atherosclerosis [31]. Furthermore, [10.1 c en 10.2 g](#) mice resemble the human lipoprotein profile very well and is therefore a suitable model to study cholesterol and lipoprotein metabolism. The LDL receptor is a membrane receptor located on the surface of many cells types and its function is to mediate the endocytosis of circulating LDL. The main aspect that makes [10.1 c en 10.2 g](#) mice a favorable model over all other obese animal model is its close resemblance to human hypercholesterolemia since most cholesterol is transported by LDL particles [32] [33]. In contrast to most obesity animal models, [10.1 c en 10.2 g](#) mice have elevated VLDL and LDL cholesterol instead of HDL cholesterol in their blood serum therewith resembling the human-like lipoprotein profile [31]. Studies in humans can illustrate an the association of ischemic stroke and obesity, however clinical research is limited to study the underlying pathological mechanisms of both diseases. This is why it is inevitable to perform translational animal studies. Animal models provide the opportunity to test (1) the impact of stroke and (2) the efficacy of intervention approaches (exercise) in adiposity, anatomical, metabolic, cerebral and neurochemical detail. We agree that all animal models of disease do not fully resemble the human condition. Nevertheless, especially in regard to obesity research, animal models were helpful to generate significant scientific research output that also had a significant clinical impact in the past. All in all, [10.1 c en 10.2 g](#) mice challenged with a HFD have proven, also in other studies, to develop many comorbidities (like hypercholesterolemia, diabetes type II, and cardiovascular risk factors) as present in human obese patients [33, 34]. In comparison, the well-known obese ob/ob mice develop severe obesity and hyper inflammation immediately after weaning (without HFD feeding), are fragile and easily stressed, making it challenging in these transgenic mice to keep mortality low after surgery, perform behavioral experiments adequately, and study exercise. Phenotypically similar to the ob/ob mice are the db/db mice, which resemble also a severe model of morbid obesity already after weaning [29]. Weight gain in these animals is caused by uncontrollable food intake, due to a disturbed leptin pathway. This animal model is expressing hyperlipidemia as well, however the lipoprotein profile is not translational to humans. Ob/ob and db/db mice show elevated HDL rather than very low density lipoprotein (VLDL) or LDL as it is observed in obese humans [35]. Also, HFD fed wild-type animals develop very mild features of obesity, including weight gain, glucose intolerance and insulin resistance [36]. However, cardiovascular risk factors are not developed and therefore this obesity model is considered to be less translational to human obese individuals [36]. Moreover, our research lab as well as our collaborating partners at [10.1 c en 10.2 g](#), used high-fat diet induced [10.1 c en 10.2 g](#) mice to test different (dietary-) interventions approaches to counteract obesity-induced metabolic and cerebral damages [37]. All of these studies show that brain and metabolic and cardiovascular pathology due to obesity in [10.1 c en 10.2 g](#) animals can be reversed/inhibited.

These

data show that the brain (vasculature) and the metabolism of HDF fed [10.1 c en 10.2 g](#) mice have the potential to recover meaning that the same animal model has the potential to recover after ischemic stroke induction by improving/recovering cerebral vascular health and neuronal tissue. In comparison to stroke in humans, mice recover faster from an ischemic insult which is therefore less severe. Their initial body weight is reached within approximately 1 week after stroke surgery. Nevertheless, MCAO induces all stroke-related pathologies, such as an ischemic injury in the MCAO territory, behavioral/motor disturbances (e.g. reduced strength, limb paralysis) as well as molecular response, including inflammation. Although the kinetics differ considerably during recovery between mice and human after a stroke, the principal events leading to post-stroke recovery are widely concordant in humans and animals [38].

In humans 87% of all strokes are of ischemic nature and occur most commonly in the territory of the middle cerebral artery. Using transient middle cerebral artery occlusion, we are targeting the region which is affected in most stroke patients. The initial stroke in the animal model is indeed not spontaneous as in humans. In our previous studies, using exactly the same stroke-mouse-model and set-ups, all stroke-mice showed comparable, reproducible infarct sizes, disturbed functional and structural connectivity networks, and also the same decrease in cerebral blood flow measured in vivo by MRI [39-41]. Additionally, we could also detect comparable stroke-related behavioral changes after the experimental stroke [39-41]. Moreover, the immunohistochemical data of our previous stroke studies revealed also ex vivo reproducible stroke-effects on angiogenesis, synaptogenesis, neuroinflammation, and also on neurogenesis [39-41]. Furthermore, it was shown that [10.1 c en 10.2 g](#) show spontaneous high number of thrombotic occlusion due to vascular disturbances [42]. Moreover, in a study by Girod and colleagues it was shown that HFD feeding in [10.1 c en 10.2 g](#) renders the myocardium of the mice more susceptible to ischemia-reperfusion injury also causing increased risk on acute spontaneous thrombotic occlusions in the brain. Thus, the expression of cardiovascular diseases in this mouse model is also leading to higher chances of ischemic events [42]. The myocardium infarct model and the ischemic stroke model are comparable due to similarities in etiology and risk factors [43]: Inside the arteries fatty substances (LDL cholesterol) can build up and form atherosclerotic plaques that narrow the vessels [44]. The most common complication seen in myocardial infarction is the blockage of the coronary arteries by an atherosclerotic plaque or a thrombus which is formed from the atherosclerotic plaque [44]. The thrombi formed in arteries can travel to other parts of the body such as the brain, where they may cause an ischemic stroke [44]. The atherosclerotic plaques present in other vessels can also rupture inside the vessel walls leading to arterial thrombosis [44]. [10.1 c en 10.2 g](#)

References:

1. Matsuda, M. and I. Shimomura, *Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2014. 15(1): p. 1-10.
2. Seaman, D.R., *Weight gain as a consequence of living a modern lifestyle: a discussion of barriers to effective weight control and how to overcome them*. *Journal of chiropractic humanities*, 2013. 20(1): p. 27-35.
3. Oesch, L., et al., *Obesity paradox in stroke—Myth or reality? A systematic review*. *PLoS One*, 2017. 12(3).
4. Stevens, G.A., et al., *National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences*. *Population health metrics*, 2012. 10(1): p. 22.

5. de Mutsert, R., et al., *The Netherlands Epidemiology of Obesity (NEO) study: study design and data collection*. *European journal of epidemiology*, 2013. **28**(6): p. 513-523.
6. Strazzullo, P., et al., *Excess body weight and incidence of stroke: meta-analysis of prospective studies with 2 million participants*. *Stroke*, 2010. **41**(5): p. e418-e426.
7. Kurth, T., et al., *Body mass index and the risk of stroke in men*. *Archives of internal medicine*, 2002. **162**(22): p. 2557-2562.
8. Grant, I. and K. Adams, *Neuropsychological assessment of neuropsychiatric and neuromedical disorders*. 2009: Oxford University Press.
9. Tatemichi, T.K., et al., *Clinical determinants of dementia related to stroke*. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 1993. **33**(6): p. 568-575.
10. Lyden, P., *Thrombolytic therapy for acute stroke--not a moment to lose*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **359**(13): p. 1393.
11. Belayev, L., et al., *Docosahexaenoic acid therapy of experimental ischemic stroke*. *Translational stroke research*, 2011. **2**(1): p. 33-41.
12. [10.1 e.n 10.2 g](#), [10.2 e.en g](#)
13. Anstey, K., et al., *Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies*. *Obesity Reviews*, 2011. **12**(5): p. e426-e437.
14. Heuschmann, P.U., et al., *Control of main risk factors after ischaemic stroke across Europe: data from the stroke-specific module of the EUROASPIRE III survey*. *European journal of preventive cardiology*, 2015. **22**(10): p. 1354-1362.
15. Ryu, W.-S., et al., *Body mass index, initial neurological severity and long-term mortality in ischemic stroke*. *Cerebrovascular Diseases*, 2011. **32**(2): p. 170-176.
16. Maysami, S., et al., *Prolonged diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke*. *Journal of neuroinflammation*, 2015. **12**(1): p. 140.
17. Haley, M.J. and C.B. Lawrence, *Obesity and stroke: Can we translate from rodents to patients?* *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2016. **36**(12): p. 2007-2021.
18. Deguchi, I., et al., *Relationship of obesity to recanalization after hyperacute recombinant tissue-plasminogen activator infusion therapy in patients with middle cerebral artery occlusion*. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 2012. **21**(3): p. 161-164.
19. Thieme, H., et al., *Mirror therapy for patients with severe arm paresis after stroke—a randomized controlled trial*. *Clinical rehabilitation*, 2013. **27**(4): p. 314-324.
20. Shelton, F.t.d.N. and M.J. Reding, *Effect of lesion location on upper limb motor recovery after stroke*. *Stroke*, 2001. **32**(1): p. 107-112.
21. Ogoh, S. and P.N. Ainslie, *Cerebral blood flow during exercise: mechanisms of regulation*. *Journal of applied physiology*, 2009. **107**(5): p. 1370-1380.
22. Van Praag, H., *Neurogenesis and exercise: past and future directions*. *Neuromolecular medicine*, 2008. **10**(2): p. 128-140.
23. Veldsman, M., et al., *Physical activity after stroke is associated with increased interhemispheric connectivity of the dorsal attention network*. *Neurorehabilitation and neural repair*, 2017. **31**(2): p. 157-167.
24. Graham, L.C., et al., *Exercise prevents obesity-induced cognitive decline and white matter damage in mice*. *Neurobiology of aging*, 2019. **80**: p. 154-172.
25. [10.2 e.en g](#)
27. Rosa, G.L. and L.M. Biasucci, *The gut microbiota and atherosclerosis: the state of the art and novel perspectives*. *Cardiovascular Innovations and Applications*, 2016. **1**(4): p. 433-442.
28. [10.2 e.en g](#)

29. Battaglini, D., et al., *Gut microbiota in acute ischemic stroke: from pathophysiology to therapeutic implications*. *Frontiers in Neurology*, 2020. **11**.
30. Monda, V., et al., *Exercise modifies the gut microbiota with positive health effects. Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. **2017**.
31. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *Animal models of atherosclerosis*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2012. **32**(5): p. 1104-1115.
32. Defesche, J.C. *Low-density lipoprotein receptor-its structure, function, and mutations*. in *Seminars in vascular medicine*. 2004. Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ...
33. Ma, Y., et al., *Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet*. *PLoS one*, 2012. **7**(4): p. e35835.
34. Radonjic, M., et al., *Differential effects of drug interventions and dietary lifestyle in developing type 2 diabetes and complications: a systems biology analysis in LDLr-/- mice*. *PLoS one*, 2013. **8**(2): p. e56122.
35. Kennedy, A.J., et al., *Mouse models of the metabolic syndrome*. *Disease models & mechanisms*, 2010. **3**(3-4): p. 156-166.
36. Lang, P., et al., *Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 1-14.
37. [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
42. Kraft, P., et al., *Hypercholesterolemia induced cerebral small vessel disease*. *PLoS one*, 2017. **12**(8): p. e0182822.
43. Girod, W.G., et al., *Effects of Hypercholesterolemia on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in LDL Receptor-Deficient Mice*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1999. **19**(11): p. 2776-2781.
44. Wolf, D. and K. Ley, *Immunity and inflammation in atherosclerosis*. *Circulation research*, 2019. **124**(2): p. 315-327.

3.2 Purpose

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

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

The main objectives of this study are:

- (1) To investigate the acute and long-term effects of voluntary exercise (running wheels) as a treatment for stroke in obesity in this animal model of obesity.
- (2) To investigate the relation/intertwining of obesity and stroke pathology and their impact on brain structure and function and underlying mechanisms.

To realize our objectives, we will for the first time induce a mild experimental stroke in high fat diet induced obese [REDACTED] mice by a transient middle artery occlusion. We have performed (longitudinal) studies with the same mouse models of high-fat diet induced obese [REDACTED] mice before and collaborate with [REDACTED] which are experts in performing research with this mouse strain [REDACTED]. Transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) is a well-described stroke model in literature and our research group has extensive experience with the induction of tMCAo in mice and we are collaborating with experts in this field [REDACTED],