

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202216338	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 17-8-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x				x	
4	NTS bij aanvraag			x						
5	E-mail CCD aan DEC verzoek om advies, d.d. 18-8-2022				x		x		x	
6	DEC advies, d.d. 27-9-2022				x		x		x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
8	Bijlage dierproeven na DEC advies				x				x	
9	NTS na DEC advies			x			x		x	x
10	Adviesnota aan CCD, d.d. 30-09-2022 met opmerkingen				x		x		x	x
11	Adviesnota aan CCD, d.d. 30-09-2022				x		x		x	
12	E-mail CCD aan vergunninghouder over aanvraag projectvoorstel, d.d. 31-05-2022				x		x		x	
13	Adviesnota aan CCD, d.d. 06-10-2022				x		x		x	x
14	Adviesnota aan CCD, d.d. 17-10-2022				x		x		x	x
15	Reactie op vragen CCD				x				x	
16	Aanvraag projectvergunning na CCD vragen, d.d. 17-8-2022				x		x		x	
17	Projectvoorstel na CCD vragen				x		x		x	
18	Bijlage dierproeven na CCD vragen				x		x		x	
19	NTS definitief			x						
20	Beschikking, d.d. 17-10-2022				x		x		x	
21	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over projectvergunning, d.d. 18-10-2022				x		x		x	



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

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

## 1

### Gegevens aanvrager

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

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum   01-9-2022 Einddatum (t/m)   31-8-2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nieuwe medicijnen tegen beroerte en dementie
3.4		Naam DEC   5.1 lid2h Postadres

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

E-mailadres

5.1 lid2e

## 4 Factuurgegevens

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

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

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

Ordernummer:

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

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

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

Naam

5.1 lid2e

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

17-08-2022

Handtekening

5.1 lid2e



## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

#### Stroke and Vascular Dementia

Stroke is the second most common cause of death and the third most common cause of disability worldwide (1)(2). In addition, stroke is a major risk factor for cognitive impairment and dementia (3). Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide (4), of which 20% are due to vascular pathology, a.k.a.

vascular dementia (VaD) (3). VaD results from large vessel (stroke) or small vessel diseases (genetic or sporadic forms)(5). The pathological mechanisms of stroke and VaD are both linked to impairment of the cerebral blood flow (Figure 1).

### **Cerebral blood flow and neurovascular coupling**

The brain represents about 2% of the body weight and despite its relatively small size, it accounts for 20% of the oxygen and energy consumed by the body. (6). Since the brain is not designed to store energy, it relies on a dense vascular network to meet its high metabolic demand. The largest proportion of vessels in the brain are capillaries who represent a mesh with a total length of > 600 kilometers (7). This ensures an adequate supply of oxygen and nutrients to every brain cell. Beyond their high density, the cerebral capillaries are remarkable for their unique ability to tightly regulate the passage of blood-borne molecules to the brain. This so-called blood-brain barrier (BBB) protects the brain from harmful molecules and allows the entry of nutrients and immune modulating molecules and cells. Another specific feature of these cerebral small vessels is their highly dynamic propensity to regulate their diameter in order to adjust the blood flow to match the local energy demand. This phenomenon is described as neurovascular coupling (NVC), which relies on the activity of surrounding pericytes and astrocytes that translate neuronal activity into a vasodilatory message to increase the cerebral blood flow (CBF).

A decreased CBF is observed in both, stroke (penumbra area) and VaD (8–10). This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (e.g. catecholamines; angiotensin II) as well as from endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (11, 12)(20).

### **Molecular mechanisms associated with impaired blood flow**

#### 1) Exacerbation of Angiotensin II – AT<sub>1</sub>R signalling during stroke (Figure 1)

Angiotensin II (AngII) is a hormone that causes vasoconstriction and thereby increases the blood pressure. The contribution of AngII to the functional and structural remodelling of the cerebral vasculature is well known (13–16). AngII binds mainly to the Angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) to promote vasoconstriction (17, 18). AT<sub>1</sub>R is involved in vascular pathologies including ischemic stroke (19). During stroke, an increased production of Ang II is observed in the brain (20) leading to an increased AT<sub>1</sub>R-mediated vasoconstriction (21). This leads to a reduction in perfusion of brain tissue in the penumbra area, with subsequent expansion of the ischemic area and severity of the clinical consequences (19). This has led to the development of AT<sub>1</sub>R antagonists (or AngII Receptor blockers, ARBs, used since 30 years in clinical practice as anti-hypertensive drugs). ARBs have shown to be effective to increase CBF and protect from ischemic stroke in pre-clinical models (22–25). Numerous clinical trials have largely demonstrated the benefit of ARBs for stroke prevention (26, 27), but their contribution for the treatment of stroke remains debated (28, 29). While the Ang II – AT<sub>1</sub>R pathway is recognized as deleterious for CBF, its full blockade by AT<sub>1</sub>R antagonist may not be effective to maintain a physiological CBF.

#### 2) Impaired NO-sGC-cGMP signalling (Figure 1)

Nitric oxide (NO) is a key vasodilatory molecule that is produced by endothelial cells. NO stimulates the enzyme soluble guanylate cyclase (sGC) to produce the intracellular second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP)(30). The released cGMP can thereafter promote smooth muscle relaxation by activating the protein kinase G (PKG) that controls the myosin light chain phosphatase activity. The endothelial NO synthase (eNOS) and the sGC are found in vascular endothelial cells and their activity is decreased by hypertension following stroke, but also in brains of AD patients (31–33). Furthermore pathological processes in stroke and VaD, include increased oxidative stress and endothelial dysfunction, associated with decreased NO production, which in turn might lead to cognitive impairments (34–36).

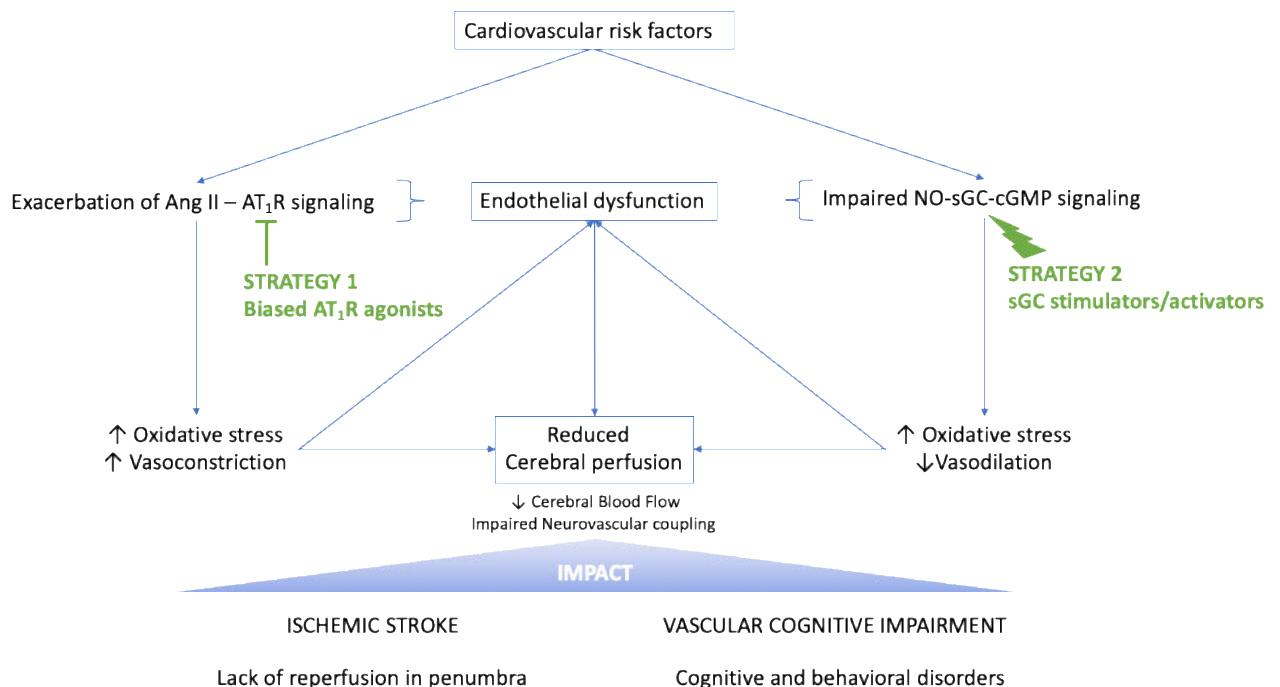
## Proposed pharmacological strategies to prevent or restore cerebral blood flow

### 1) AT<sub>1</sub>R biased agonists (Fig1)

Biased agonism is the ability of a ligand to selectively activate a part of the signalling cascade associated to a given receptor. AT<sub>1</sub>R biased agonists are thus capable of activating  $\beta$ -arrestin-mediated signalling without activation of the classical Gq pathway that would promote vasoconstriction. In addition to their role to promote receptor internalization, including AT<sub>1</sub>R (37),  $\beta$ -arrestins can also activate signaling pathways leading to vascular remodelling that may possibly improve perfusion (38–40). This selective agonism offers thus new therapeutic perspectives. AT<sub>1</sub>R biased agonists are capable of activating the  $\beta$ -arrestin pathway of the AT<sub>1</sub>R without switching the Gq/11 pathway on (e.g. TRV120027)(41). It has been shown to decrease the blood pressure and improve cardiac contractility in healthy condition (41). This beneficial cardiovascular effect was also demonstrated in a canine model of heart failure, in which systemic vascular resistance was decreased thereby decreasing the heart's pumping activity (42). These studies support the benefits of biased AT<sub>1</sub>R for cardiovascular pathologies, yet their impact on cerebral perfusion remains to be investigated.

### 2) sGC stimulators/activators (Fig 1)

sGC can be targeted by sGC stimulators and activators. sGC stimulators act on the NO-sensitive sGC, whereas activators specifically target the NO non-sensitive sGC(43). sGC stimulators and activators have been developed for cardiovascular therapy (44). These drugs are able to increase the enzymatic activity of sGC to generate cGMP independently of NO. This drug class is being tested for pulmonary hypertension and heart failure but investigations at the cerebrovascular level to preserve cerebral blood flow are lacking.



**Figure 1:** Schematic representation of the implication of the Angiotensin-II-AT<sub>1</sub>R and NO-sGC-cGMP pathways for brain perfusion. Both pathways are impacted by cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes) which can impair the cerebral perfusion. The proposed pharmacological strategies to counteract these pathological mechanisms are shown in green. Exacerbation of Angiotensin II – AT<sub>1</sub>R signalling and impairment of NO-sGC-cGMP signalling contribute to the reduction of cerebral perfusion, promoting the development of cerebral lesions and dysfunction in the context of ischemic stroke and vascular cognitive

impairment and dementia. We aim to assess the relevance of biased AT<sub>1</sub>R agonists (Strategy 1) and sGC activators/agonists (Strategy 2) to preserve cerebral blood flow and neurovascular coupling.

### 3.2 Purpose

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

- If applicable, describe all subobjectives

#### Ultimate goal

The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke and vascular dementia.

We will specifically assess the ability of AT<sub>1</sub>R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions.

#### Sub-objectives

Aim 1: To study the impact of AT<sub>1</sub>R biased agonists on CBF regulation:

- a) in healthy mice;
- b) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis) ;

Aim 2: To study the impact of sGC stimulators/activators on CBF regulation:

- a) in healthy mice;
- c) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis).

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The feasibility of the project is warranted by the scientific and technical skills present with the researchers of our team:

- pharmacology of the renin-angiotensin-system including AT<sub>1</sub>R (15, 16, 45-48)
- pharmacology of sGC-cGMP signalling (49-51)
- animal models of vascular cognitive impairment (52-54)
- CBF imaging in hypoperfused mice (Bilateral Carotid Artery Stenosis model) for the study of neurovascular coupling (PV2017-001)

The project's feasibility is further strengthened by the existence of previous pre-clinical and clinical studies who have successfully used the proposed pharmacological approaches for cardiovascular indications other than stroke, such as heart failure (41, 42, 55, 56) – this demonstrates the safety of the proposed pharmacological interventions. Identifying beneficial effects in pre-clinical models may pave the way for drug clinical trials for both stroke and vascular dementia indications.

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

No

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



### 3.3 Relevance

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

This project is of relevance for cerebrovascular diseases and especially for conditions like ischemic stroke and vascular- dementia.

##### Stroke

Estimates from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD 2010) ranked stroke as the second most common cause of death(1) and the third most common cause of disability worldwide in 2010(2). In 2019, stroke was still the second cause of death worldwide according to the World Health Organization (WHO Health report 2019). The treatment of acute ischemic stroke has undergone dramatic changes recently subsequent to the demonstrated efficacy of endovascular thrombectomy(57). The selection of patients for this therapy is however based on timely CT or MR imaging and should be initiated within 6 hours of stroke onset. Alternatively intravenous thrombolysis with tissue-type plasminogen activator remains the standard acute stroke therapy within the initial 3-4.5 hours after stroke onset(58). Overall, the therapeutic time window and eligibility criteria for both approaches remain limited and new therapeutic options are urgently needed to restore CBF in the ischemic and at-risk areas. To circumvent this temporal challenge, clinicians are in urgent need of treatments for sub-acute (>6h) and post-acute/chronic management of stroke patients.

##### Dementia

Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide, while nearly 10 million new cases are reported each year, with WHO estimations of 82 million cases in 2030 due to ageing(4). Out of all dementia cases, approximately 20% show VaD pathology(3). VaD causes the impairment of at least one cognitive domain that severely disrupts daily living. The treatment regime involves lifestyle interventions, control of vascular risk factors, and cognition enhancers that were originally developed for Alzheimer's disease (AD)(59). Yet there is only limited evidence that any of these treatments prevent disease progression.

##### References

1. R. Lozano *et al.*, *Lancet*. **380**, 2095–2128 (2012).
2. *Alzheimer's & Dementia*. **16**, 391–460 (2020).
3. WHO | Dementia: a public health priority. WHO, (available at [http://www.who.int/mental\\_health/publications/dementia\\_report\\_2012/en/](http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/)).
4. Geneva: World Health Organization, *Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025* (WHO, 2017).
5. M. Dichgans, D. Leys, *Circ. Res.* **120**, 573–591 (2017).
6. M. E. Raichle, D. A. Gusnard, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**, 10237–10239 (2002).
7. D. J. Begley, M. W. Brightman, *Prog Drug Res.* **61**, 39–78 (2003).
8. S. M. Wong *et al.*, *Neurology*. **92**, e1669–e1677 (2019).
9. J. F. A. Jansen *et al.*, *Sci Rep*. **6**, 10 (2016).
10. L. Østergaard *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab.* **33**, 635–648 (2013).
11. M. G. Myers, J. W. Norris, V. C. Hachniski, M. J. Sole, *Stroke*. **12**, 200–204 (1981).
12. J. Schulze, A. Vogelgesang, A. Dressel, *Aging Dis.* **5**, 327–339 (2014).
13. F. Dupuis, J. Atkinson, P. Limiñana, J.-M. Chillon, *Br. J. Pharmacol.* **144**, 349–356 (2005).
14. F. Dupuis, J. Atkinson, P. Limiñana, J.-M. Chillon, *J. Hypertens.* **23**, 1061–1066 (2005).
15. S. Foulquier *et al.*, *PLoS ONE*. **7**, e42469 (2012).
16. S. Foulquier, I. Lartaud, F. Dupuis, *PLoS ONE*. **9**, e110766 (2014).
17. J.-M. Vincent *et al.*, *Stroke*. **36**, 2691–2695 (2005).
18. S. Foulquier, U. M. Steckelings, T. Unger, *Nature*. **493**, S9 (2013).
19. T. Walther *et al.*, *FASEB J.* **16**, 169–176 (2002).
20. J. Li *et al.*, *BMC Complement Altern Med.* **14**, 441 (2014).
21. E. Stenman, L. Edvinsson, *Stroke*. **35**, 970–974 (2004).
22. J. Zhou *et al.*, *Stroke*. **37**, 1271–1276 (2006).
23. Y. Nishimura, T. Ito, J. M. Saavedra, *Stroke*. **31**, 2478–2486 (2000).
24. W. Groth, A. Blume, P. Gohlke, T. Unger, J. Culman, *J. Hypertens.* **21**, 2175–2182 (2003).
25. T. Ito *et al.*, *Stroke*. **33**, 2297–2303 (2002).
26. B. Dahlöf *et al.*, *Lancet*. **359**, 995–1003 (2002).
27. H. Lithell *et al.*, *J Hypertens.* **21**, 875–886 (2003).
28. J. Schrader *et al.*, *Stroke*. **34**, 1699–1703 (2003).
29. E. C. Sandset *et al.*, *Lancet*. **377**, 741–750 (2011).
30. F. Z. Mónica, K. Bian, F. Murad, *Adv Pharmacol.* **77**, 1–27 (2016).
31. T. M. Paravicini, R. M. Touyz, *Cardiovasc Res.* **71**, 247–258 (2006).
32. F. Langhauser *et al.*, *NPJ Syst Biol Appl.* **4**, 8 (2018).
33. W. L. Bonkale, B. Winblad, R. Ravid, R. F. Cowburn, *Neurosci Lett.* **187**, 5–8 (1995).
34. T. M. De Silva, F. M. Faraci, *Cell Mol Neurobiol.* **36**, 241–258 (2016).
35. S. Chrissobolis, A. A. Miller, G. R. Drummond, B. K. Kemp-Harper, C. G. Sobey, *Front. Biosci.* **16**, 1733–1745 (2011).

36. E. Cuadrado-Godia *et al.*, *J Stroke*. **20**, 302–320 (2018).
37. L. Hunyady, K. J. Catt, A. J. Clark, Z. Gáborik, *Regul Pept*. **91**, 29–44 (2000).
38. R. T. Kendall *et al.*, *J Biol Chem*. **289**, 26155–26166 (2014).
39. L. M. Luttrell *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 2449–2454 (2001).
40. Y. Taniyama *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol*. **287**, C494–499 (2004).
41. G. Boerrigter *et al.*, *Circ Heart Fail*. **4**, 770–778 (2011).
42. G. Boerrigter, D. G. Soergel, J. D. Violin, M. W. Lark, J. C. Burnett, *Circ Heart Fail*. **5**, 627–634 (2012).
43. P. Sandner *et al.*, *Handb Exp Pharmacol*. **264**, 355–394 (2021).
44. S. Breitenstein, L. Roessig, P. Sandner, K. S. Lewis, *Handb Exp Pharmacol*. **243**, 225–247 (2017).
45. C. Delaitre, M. Boisbrun, S. Lecat, F. Dupuis, *Int J Mol Sci*. **22**, 6738 (2021).
46. M.-L. Bouessam *et al.*, *Br J Pharmacol*. **176**, 2049–2062 (2019).
47. M. Meyer *et al.*, *Eur J Med Chem*. **158**, 334–352 (2018).
48. S. Foulquier *et al.*, *J Hypertens*. **29**, 1392–1399 (2011).
49. L. G. J. M. Borghans, A. Sambeth, J. Prickaerts, J. G. Ramaekers, A. Blokland, *Psychopharmacology (Berl)*. **235**, 2407–2416 (2018).
50. E. Nelissen *et al.*, *Biomedicines*. **9**, 1047 (2021).
51. J. Prickaerts, J. de Vente, W. Honig, H. W. M. Steinbusch, A. Blokland, *Eur. J. Pharmacol*. **436**, 83–87 (2002).
52. S. Foulquier *et al.*, *Hypertens. Res*. **41**, 817–827 (2018).
53. D. Kerkhofs *et al.*, *Theranostics*. **10**, 9512–9527 (2020).
54. T. Koizumi *et al.*, *J Neuroinflammation*. **16**, 79 (2019).
55. G. M. Felker *et al.*, *JACC Heart Fail*. **3**, 193–201 (2015).
56. P. W. Armstrong *et al.*, *N Engl J Med*. **382**, 1883–1893 (2020).
57. O. A. Berkhemer *et al.*, *N. Engl. J. Med*. **372**, 11–20 (2015).
58. L. Catanese, J. Tarsia, M. Fisher, *Circ Res*. **120**, 541–558 (2017).
59. O. A. Skrobot *et al.*, *Alzheimers Dement*. **14**, 280–292 (2018).

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

#### Academic sector

We aim to unravel mechanisms of relevance to protect from cerebrovascular diseases by targeting two different signalling pathways. This project will bring new insights on the studied pharmacological targets.

#### Pharmaceutical industry

Our pre-clinical investigations will be useful for R&D sectors of pharmaceutical companies. By validating the relevance of the studied targets, it may attract companies to screen their small molecule libraries to identify and screen new drug candidates with increased selectivity and efficacy.

#### Society /Patients

This study is intended to test drugs that may prevent cognitive impairment after stroke or VaD. .  
Stronger - stroke outcome

#### Animals

To limit the impact on animals, the most relevant models with the least discomfort have been selected for the study of ischemic stroke and vascular dementia. Furthermore, all procedures will be approved by the animal welfare committee to guarantee a minimal discomfort and ensure the group size is adequate to assess relevant differences on the main readout parameters.

## 3.4 Strategy

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

We will study the effect of acute and chronic impact of the proposed treatment.

Acute treatment: It is important to assess the acute effect of the drug on cerebral blood flow to know if we can expect a beneficial effect in the acute treatment phase of stroke, due to immediate vaso-active effects.  
Chronic treatment: It is important to assess the chronic effect of the drug on cerebral blood flow to study possible beneficial effect in a chronic condition like VaD possibly mediated by cellular effects such as angiogenesis, in addition to the vaso-protection.

#### Acute treatments (Figure 3)

A maximum of 3 compounds will be administered acutely (i.v.) in healthy and diseased mouse models per drug class (i.e., biased AT<sub>1</sub>R agonist and sGC stimulator/activator). The number of compounds to be tested

is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.

- In healthy mice, the aim is to assess their acute impact on resting physiological CBF;
- In diseased models (1 ischemic stroke model = distal middle cerebral artery occlusion and 1 cerebral hypoperfusion model to mimic VaD = bilateral carotid artery stenosis), the aim is to assess their ability to restore impaired CBF.

The presence of an effect in healthy mice is not a pre-requisite for the study of the corresponding compound in diseased models. Indeed, a compound might not increase the cerebral blood flow in mice with a physiological values while it might however still prove to be beneficial in diseased models where the flow is reduced.

In addition, the compounds may be studied in both diseased models: the presence of an effect in one diseased model is not a pre-requisite for its study in the second diseased model. Since the pathophysiological mechanisms differ in both diseased models, one compound may be effective in restoring CBF in one condition only.

N.B.: the study of AT<sub>1</sub>R biased agonists will require the administration of the natural ligand Angiotensin II to observe the counteracting AT<sub>1</sub>R effects of the tested compound. This will be done in healthy and diseased animals as the expression of AT<sub>1</sub>R will differ with the condition. The procedure will be detailed in the corresponding working protocol. In short, Ang II will be administered before and after the acute administration of the biased agonist.

#### Chronic treatments (Figure 3)

A maximum of 3 compounds per drug class will be tested in chronic conditions in healthy and diseased mouse models. The duration of the administration will be adapted to each animal model to match the time course of the CBF reduction: 1 week maximum for the ischemic stroke model and 3 weeks maximum for the cerebral hypoperfusion model.

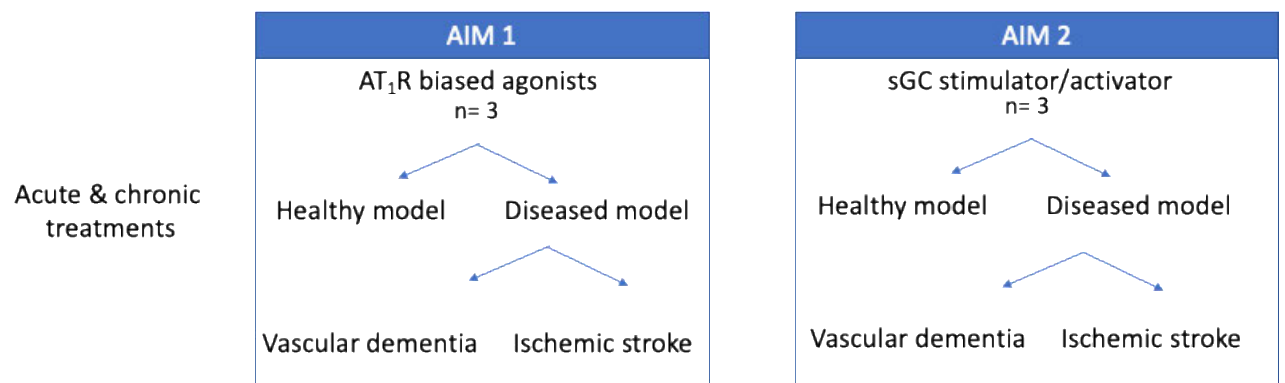


Figure 3: Schematic overview of the study design for both Aim1 and Aim2.

#### 3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The strategy has been chosen to characterize the acute and chronic effects of the compounds on the CBF in health and disease. To assess the differential impact of the studied signalling pathways on physiological and pathological CBF, the tested drugs will be studied in healthy and diseased animal models that exhibit an impaired CBF. This will be achieved in the Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) model to induce ischemic stroke and in the Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS) model to mimic VaD (see Appendix 1). These 2 models have been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:

Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostratial arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the

cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.

Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion
2	
3	
4	



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

## 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

Serial number	Type of animal procedure
1	Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

### Ultimate goal

To assess the ability of AT<sub>1</sub>R biased agonists (Aim 1) and sGC stimulators/activators (Aim 2) to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions (Figure 1). The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.

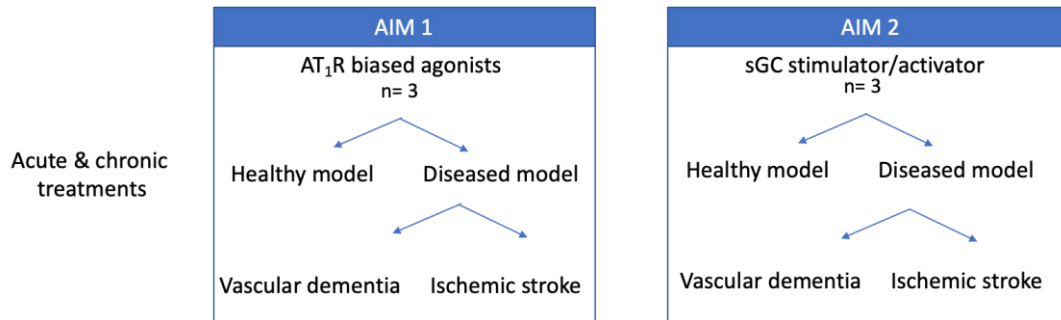


Figure 1: Overview of the experimental design

### Disease models:

**Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion:** this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostratial arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. (Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.)

**Bilateral Carotid Artery Stenosis:** this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

**Primary outcome parameter for both Aims 1 and 2:** relative cerebral blood flow changes (CBF in %) vs baseline or control and cerebral blood flow change mediated by neurovascular coupling (in %).

**Justification:** A decreased CBF is observed in both, stroke and VaD. This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (focus of Aim 1) as well as from an endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (focus of Aim 2). We want therefore to assess the efficacy of modulating the signalling pathways to improve CBF and CBF reactivity in healthy and disease condition.

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

Overview of the proposed animal procedures:

N.B.: not all procedures will be performed in all animals. The different animal studies and the associated estimated cumulative discomforts are listed in the Table section B.

Procedures	Nature	Duration & Frequency
Body weight measurement	Non-invasive, awake animals	Max. 1x/day
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)	Invasive, anaesthetized animals	1x
Garcia neurological test	Non-invasive, awake animals	Max. 1x/day
Distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO)	Invasive, anaesthetized animals	1x
Vessel cannulation	Invasive, anaesthetized animals	Max 1x
CBF measurement and neurovascular coupling	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 2x
Treatment in drinking water or gavage*	Non-invasive, awake animals	Max 1x/day (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)
Treatment via SC injection*	Minimally invasive, awake animals	Max 1x/day (acute study: max 7 days; not for chronic study)
Treatment via osmotic minipump	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 1x implantation (duration max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)
Blood collection**	Minimally invasive, awake, restrained animals	1x/week (duration max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)
I.V. injection of tracers	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 1x
Terminal anesthesia and perfusion	Invasive, anaesthetized animals	Max 1x

\*: The administered volumes and frequency of the administration procedures (oral gavage and injections) will follow NC3R guidelines (<https://researchanimaltraining.com/article-categories/procedures-with-care/>)

\*\* : Maximum blood volume and frequency of blood collection will follow NC3R guidelines (<https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse> )

Description and justification of the proposed animal procedures:

Body weight measurement: Regular body weight measurement to monitor the animal welfare;

Blood collection: venous blood collection to assess systemic parameters involved the disease progression (e.g. inflammatory cytokines) and the impact of drug treatments (mild discomfort). Maximum blood volume and intervals for blood collection will follow NC3R guidelines (<https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse>) ;

Vessel cannulation under anesthesia (terminal procedure):

- cannulation of the femoral artery to allow acute blood pressure measurement during the CBF imaging which is of importance to assess the acute drug effects on the blood pressure regulation and its possible impact on CBF regulation;
- cannulation of the carotid artery to allow injection of compounds and the study their acute effects on the CBF
- cannulation of the jugular vein to allow perfusion of anaesthetics.

CBF measurement and neurovascular coupling: the cortical CBF will be assessed in anaesthetized animals using a laser doppler or speckle contrast imaging technique. This will require a minimally-invasive surgical procedure to image the CBF transcranially. CBF measurement will be performed under conditions to test the cerebrovascular reactivity such as neurovascular coupling (e.g. whisker stimulation; injection of drugs) (mild discomfort).

Drug treatments: the least invasive administration routes will be preferred.

i.v. injection of tracers: injection of vascular tracers to assess the blood brain barrier permeability by immunohistochemistry

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS): this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm. The animals will be studied for a maximum period of 3 weeks as this is the maximal period with constant CBF reduction and period when structural brain lesions and cognitive decline develop. We will therefore study the impact of acute treatment (1 week, with established CBF reduction but no major lesion) and chronic treatment (3 weeks, CBF reduction with structural lesions). (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO): mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation. The resulting infarct is cortical and the relative infarct volume corresponds to the majority of human strokes. The animals will be studied for a maximum period of 1 week as the functional impact in the model is maximal in the first week and possible vascular collateralization can occur after 1 week. This also corresponds to the desired treatment window in stroke patients (first days after stroke). We will therefore study the impact of acute treatment (max 3 days, period in which the ischemic area is expanding and reach its maximum volume) and chronic treatment (1 week, maximum ischemic area). (Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.)

Terminal anesthesia and perfusion: perfusion protocols will be chosen based on the planned investigations ex vivo (molecular vs IHC) (mild discomfort).

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

Power calculations will be made using G\*Power considering the use of One-way ANOVA to assess the impact of the studied drug on the CBF in healthy mice (dose effect) or its impact in diseased mice (3 groups: Disease treated vs Disease non-treated, vs non-disease). Group size calculations will be based on previous own studies to take into account the variability of the main readout parameters. The calculations will be detailed in each working protocol. At this stage, the group size is estimated to be n=20/group to take into account 20% drop-out: max 5% during surgery and max 15% due to reaching humane endpoints after surgery (~15%) and mortality rates (~5%) induced by the surgical procedures (BCAS, MCAO, Sham). To calculate the group size, we will integrate a desired alpha error of 0,05 while the desired beta error will be of 0,20, thus aiming for a power of 0,80. The SD and effect size will be incorporated in the group size calculation for the working protocol using our most recent data on cerebral blood flow in mice.

**B. The animals**

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
-	Mus musculus	Licensed vendors	Adult	1800	Male	No	C57BL6/J

Provide justifications for these choices

Species	Mus musculus
Origin	Licensed vendors



Life stages

Adult:  
For Healthy groups: 8-10 weeks-old  
For BCAS/Sham: 8-10 weeks-old  
For dMCAO/Sham: 10 weeks-old

---

Number

table	Group number	Acute	Chronic	Healthy	Disease - BCAS	Disease - MCAO	Total	
1	1.1			3 compounds x 20 mice			60	
	1.2 1.3 1.4				3 compounds x (20 BCAS + 20 BCAS treated +20 Sham)		180	
	1.5 1.6 1.7					3 compounds x (20 MCAO+ 20 MCAO treated + 20 Sham)	180	
	1.8 1.9			3 compounds x 20 mice x 2 groups (treated/non-treated)			120	
	1.10 1.11 1.12				3 compounds x (20 BCAS + 20 BCAS treated +20 Sham)		180	
	1.13 1.14 1.15					3 compounds x (20 MCAO+ 20 MCAO treated + 20 Sham)	180	
	<b>Maximum total Aim 1</b>							<b>900</b>
	2	2.1			3 compounds x 20 mice			60
		2.2 2.3 2.4				3 compounds x (20 BCAS + 20 BCAS treated +20 Sham)		180
		2.5 2.6 2.7					3 compounds x (20 MCAO+ 20 MCAO treated + 20 Sham)	180
		2.8 2.9			3 compounds x 20 mice x 2 groups (treated/non-treated)			120
		2.10 2.11 2.12				3 compounds x (20 BCAS + 20 BCAS treated +20 Sham)		180
2.13 2.14 2.15						3 compounds x (20 MCAO+ 20 MCAO treated + 20 Sham)	180	
<b>Maximum total Aim 2</b>							<b>900</b>	
<b>Maximum total study</b>							<b>1800</b>	

Sham animals will be required for all diseased groups to assess if the treatment is able to restore CBF to normal values.

	<p>We will study the effect of acute and chronic impact of the proposed treatment. Acute treatment: It is important to assess the acute effect of the drug on cerebral blood flow to know if we can expect a beneficial effect in the acute treatment phase of stroke, due to immediate vaso-active effects.</p> <p>Chronic treatment: It is important to assess the chronic effect of the drug on cerebral blood flow to study possible beneficial effect in a chronic condition like VaD possibly mediated by cellular effects such as angiogenesis, in addition to the vaso-protection.</p> <p>The presence of an effect in healthy mice is not a pre-requisite for the study of the corresponding compound in diseased models. Indeed, a compound might not increase the cerebral blood flow in mice with a physiological values while it might however still prove to be beneficial in diseased models where the flow is reduced.</p> <p>In addition, the compounds may be studied in both diseased models: the presence of an effect in one diseased model is not a pre-requisite for its study in the second diseased model. Since the pathophysiological mechanisms differ in both diseased models, one compound may be effective in restoring CBF in one condition only.</p>
Gender	<p>Males will be used instead of females since the female sex steroid hormone estradiol exerts neuroprotective effects on the development of ischemic lesion, which could influence the outcome of our experiment. After menopause, the risk for stroke and dementia increase in women due to the decrease in the neuroprotective effects of estrogens. This would require to perform ovariectomy in the female mice for healthy and diseased models, significantly increasing the number of animals, considering also the additional drop-out due to the surgery. This would make the procedures unrealistic considering the number of groups to be studied. It has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study.</p> <p>Koellhoffer EC, McCullough LD. The effects of estrogen in ischemic stroke. <i>Transl Stroke Res.</i> 2013 Aug;4(4):390-401. doi: 10.1007/s12975-012-0230-5.</p> <p>Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. <i>J Cereb Blood Flow Metab.</i> 2000 Apr;20(4):631-52. doi: 10.1097/00004647-200004000-00001.</p>
Genetic alterations	No
Strain	C57BL6/J

### C. Accommodation and care

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

Yes

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

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

The surgical procedures will be performed under general anaesthesia. The depth of anaesthesia will be monitored regularly by checking the presence of reflexes. Prior, during and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent and relieve the pain associated with the surgery.

Welfare score sheets will be filled in for each animal and will be used throughout the entire duration of the study to ensure that the discomfort of the animals – due to the surgical procedures and the disease - do not exceed the humane endpoints defined for the study.

In summary, the probability of suffering will be minimized by a combination of anesthesia, pain control, optimal housing as well as regular inspection of animal welfare.

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

- 1) As a result of the BCAS and dMCAO surgeries, animals will exhibit an impaired behavior (expected); After BCAS surgery, possible neurological complications may appear such as an impaired locomotor function and behavior (hypo- or hyper-activity); an abnormal posture; a poor coat condition. After dMCAO surgery, the animals will show ischemic stroke related symptoms, varying from healthy, mild unilateral paralysis, non-severe unilateral paralysis with curving of the back to severe unilateral or bilateral paralysis with pronounced curving of the back
- 2) A risk for possible complications after surgery;
- 3) Although no major complications were observed in previous studies, there is always a risk for possible complications due to drug treatment due to an unknown/non-reported toxicity.

Explain why these effects may emerge.

- 1) This effect is expected for the model studied  
In BCAS: these effects are expected due to the reduced cerebral perfusion;  
In dMCAO: these effects are expected due to the induction of an ischemic stroke;
- 2) This effect might occur following the surgical interventions;
- 3) it is not possible to predict the absence of toxicity in the model studied.

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

- 1) To minimize discomfort post-surgery, dietgels and wet food will be made accessible to promote food and water intake. Additionally pain killer drugs will be administered in the days following the surgery. If the severity of pathology leads to the humane endpoint described below, the animal will be euthanized to avoid unnecessary pain or distress;
- 2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, a.o.) and a solution will be implemented to avoid future complications.
- 3) If the toxicity observed leads to a discomfort exceeding the moderate discomfort expected for the study and/or if it impairs the interpretation of the data, the treatment will be interrupted and animals will be euthanized if humane endpoints are reached.

## **E. Humane endpoints**

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

No > Continue with question F

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

General considerations – humane endpoints for all animals:

Humane endpoints will be considered if animals exhibit continued signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented weekly by trained and experienced team members and minimum daily during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress is (are) considered as too many, too severe or lasting too long, then this is considered as a humane endpoint and euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). The symptoms on the welfare form being scored, when relevant, are: activity, movement, coat/skin, hydration, breathing, faeces, posture, surgery site/wound site, oedema, necroses. Humane endpoints in this study will be a strong reduction in body weight according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/or rehydration, or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.

Procedure/group-dependent considerations (the criteria above still apply):

After BCAS surgery, the Garcia neurological test will be used weekly to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>.

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following BCAS surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>;
- a Garcia score  $\leq 10$  (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will reflect a severe alteration of behaviour and locomotor activity due to a major cerebral injury.

Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .

After dMCAO surgery, the animals will show ischemic stroke related symptoms. The severity of the symptoms will be assessed according to the FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report by combining general clinical observations (described above: bodyweight, appearance, behaviour) together with a procedure-specific neurologic evaluation. The neurological score used is a modified version of that described by Bihel et al. where absence (score 0), moderate presence (score 1) or presence (score 2) of a number of abnormal movements/postures are evaluated separately for each body side (i.e. ipsilateral and contralateral to MCAO lesion). The neurological score for each limb will be added to the clinical observation scoring to obtain a cumulative score. It is well known that immediately after MCAO, a high cumulative scoring is to be expected with a pro- gressive improvement over the first week post-surgery. During this critical period, animals will receive intensive care and will be frequently monitored. In particular, the first 48–72h are key to identified potential surgical complications and ensure that adverse effects are identified and actions taken to address them in a timely manner. The cumulative score will be compared to the treshold set in the working protocol. Upon reaching that threshold, it will be considered as humane endpoint and the animals will be immediately euthanized to avoid any unnecessary stress and pain by cervical dislocation.

Bihel E, Pro-Sistiaga P, Letourneur A, et al. Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioural, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations. *J Cereb Blood Flow Met* 2010; 30: 273–285.

Indicate the likely incidence.

The expected incidence is low for BCAS (5%) and moderate for dMCAO (15%).

## **F. Classification of severity of procedures**

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

In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.

An overview of the estimated discomfort per procedure and animal series and groups is given below. For clarity, the descriptions of the procedures and their corresponding discomfort have been split into 3 tables for every model (Table 1, healthy mice; Table 2, Sham and dMACO mice; Table 3, Sham and BCAS mice).

**Table A: Procedures and corresponding discomfort for the healthy mice groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B: 1.1, 1.8, 1.9, 2.1, 2.8, 2.9

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = 7 days; Chronic timepoint = 3 weeks

Procedures	Estimated discomfort	AIM 1 Acute	AIM1 Chronic	AIM 2 Acute	AIM 2 Chronic	Total
Body weight measurement	mild	60	120	60	120	360
Blood collection	moderate	60	120	60	120	360
Vessel cannulation	moderate	60	120	60	120	360
CBF measurement and neurovascular coupling	Non-recovery	60	120	60	120	360
Treatment in drinking water or gavage	moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	60	120	60	120	360
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 7 days; not for chronic study)	60	0	60	0	120
Treatment via osmotic minipump	Moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	60	120	60	120	360
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	60	120	60	120	360
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	60	120	60	120	360
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (60)</b>	<b>Moderate (120)</b>	<b>Moderate (60)</b>	<b>Moderate (120)</b>	<b>Moderate (360)</b>

**Table 2: Procedures and corresponding discomfort for the Sham/dMCAO mouse groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B:

1.5, 1.6, 1.7, 1.13, 1.14, 1.15, 2.5, 2.6, 2.7, 2.13, 2.14, 2.15

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = 3 days; Chronic timepoint = 7 days

Procedures	Estimated discomfort	AIM 1 Acute	AIM1 Chronic	AIM 2 Acute	AIM 2 Chronic	Total
------------	----------------------	-------------	--------------	-------------	---------------	-------

Body weight measurement	mild	180	180	180	180	720
Blood collection	moderate	180	180	180	180	720
Sham surgery for dMCAO	moderate	60	60	60	60	240
dMCAO surgery	severe	120	120	120	120	480
Vessel cannulation	moderate	180	180	180	180	720
CBF measurement and neurovascular coupling	Non-recovery	180	180	180	180	720
Treatment in drinking water or gavage	moderate (max 3 days for acute study; max 7 days for chronic study)	180	180	180	180	720
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 3 days; max 7 days for chronic study)	180	180	180	180	720
Treatment via osmotic minipump	Moderate (not for acute study; max 7 days for chronic study)	0	180	0	180	360
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	180	180	180	180	720
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	180	180	180	180	720
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (60) Severe (120)</b>	<b>Moderate (60) Severe (120)</b>	<b>Moderate (60) Severe (120)</b>	<b>Moderate (60) Severe (120)</b>	<b>Moderate (240) Severe (480)</b>

**Table 3: Procedures and corresponding discomfort for the Sham/BCAS mouse groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B:

1.2, 1.3, 1.4, 1.10, 1.11, 1.12, 2.2, 2.3, 2.4, 2.10, 2.11, 2.12,

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = 7 days; Chronic timepoint = 3 weeks

Procedures	Estimated discomfort	AIM 1 Acute	AIM1 Chronic	AIM 2 Acute	AIM 2 Chronic	Total
Body weight measurement	mild	180	180	180	180	720
Blood collection	moderate	180	180	180	180	720
Sham surgery for BCAS	moderate	60	60	60	60	240
BCAS surgery	moderate	120	120	120	120	480

Vessel cannulation	moderate	180	180	180	180	720
CBF measurement and neurovascular coupling	Non-recovery	180	180	180	180	720
Treatment in drinking water or gavage	moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	180	180	180	180	720
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 7 days; not for chronic study)	180	0	0	180	360
Treatment via osmotic minipump	Moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	180	180	180	180	360
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	180	180	180	180	720
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	180	180	180	180	720
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (180)</b>	<b>Moderate (180)</b>	<b>Moderate (180)</b>	<b>Moderate (180)</b>	<b>Moderate (720)</b>

**In summary, a maximum of 360+240+720 = 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice).**

For further details on the maximal discomfort for each experiment, please see the tables in section B “The Animals” of this appendix. For details on the expected levels of discomfort for the individual procedures, please see the descriptions in section A “Experimental approach and primary outcome parameters”

### **G. Replacement, reduction, refinement**

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



Replacement	<p>There is currently no alternative approach allowing the study of cerebral blood flow. There is also no alternative suitable to replace models of stroke and cerebral hypoperfusion.</p> <p>Replacement with human post-mortem material: human post-mortem samples are by definition late-stage pathological tissues that do not allow any functional and longitudinal studies</p> <p>Replacement with human participants: it is important (and mandatory) to perform pre-clinical investigations to assess the validity of the therapeutic approach. Clinical trials are also not suitable for mechanistic understanding of the pathology and treatment;</p> <p>Replacement with cells: beyond 2D cell work, 3D cell culture models that includes flow are not capable of reproducing the complexity of the cerebral cellular environment. Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents). There is also no model that allows the study of neurovascular coupling (i.e. the translation of neuronal activity into a vasodilatory reaction).</p>
Reduction	<p>The number of animals needed for this study will be calculated based on previous studies to ensure a proper statistical power is reached to assess differences in the primary readout parameters. Group size calculation will be performed prior to every working protocol as described in section A of the present appendix.</p>
Refinement	<p>In addition to measures taken to minimize pain and discomfort, environmental enrichment and social housing will be done to improve animal's welfare. Furthermore the animal models have been chosen after careful consideration of alternative models and it has been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:</p> <p>Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. <i>J. Vis. Exp.</i> 2014.</p> <p>Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion <i>Stroke</i> 2004).</p>

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

No

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

#### H. Re-use

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

No > Continue with question I.

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

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

No

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

### I. Repetition

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

not applicable

### J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Killing at the end of the procedures is necessary for the collection of tissues and material for further ex-vivo/in-vitro characterisation.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Animals will be terminally anaesthetized and undergo a cardiac perfusion protocol for the ex vivo study of brain tissue.

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

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

Naam van het project	nieuwe medicijnen tegen beroerte en dementie
NTS-identificatiecode	NTS-NL-583938 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	vasculaire dementie ischemische beroerte cerebrale bloedstroom farmacologie
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	In dit project testen we nieuwe nieuwe medicijnen voor de behandeling van een herseninfarct (beroerte) en van een specifiek type dementie (vasculaire dementie). We onderzoeken of de nieuwe medicijnen de doorbloeding in de hersenen verbetert. We onderzoeken meerdere soorten medicijnen in gezonde en zieke muismodellen, die op een verschillende manier de doorbloeding kunnen verbeteren. Het ene medicijn beïnvloedt de receptor AT1R, het andere het eiwit sGC.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	De nieuwe medicijnen kunnen mogelijk hersenschade door een beroerte of dementie beperken of vertragen.. Deze studie zal aantonen of dat het geval is in muismodellen. Als dat zo is, kan in de toekomst onderzoek worden gedaan waarbij deze nieuwe medicijnen worden vergeleken met de bestaande behandelen bij herseninfarcten en vasculaire dementie.

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Onderstaande procedures zullen bij sommige, maar niet bij alle diergroepen worden toegepast: bloedafname; een buisje in bloedvaten plaatsen; meten van de doorbloeding in de hersenen; toedienen van medicatie (oraal of injectie); operatie om de doorbloeding van de hersenen te verminderen of een beroerte te veroorzaken; verdoving/narcose om het dier te laten sterven.</p>					
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Procedures zoals bloedafname kunnen enkele minuten zorgen voor stress en lichte pijn. Ingrijpendere procedures zoals operaties zullen matig ongerief veroorzaken: het dier wordt verdoofd en krijgt pijnstillers. Verder verwachten we verlies van lichaamsgewicht en verminderd gedrag (verandering in beweging en cognitie) bij dieren die een operatie ondergaan.</p>					
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>			
			<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>				
		<p>Hergebruikt</p>		<p>Teruggeplaatst</p>		<p>Geadopteerd</p>
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren zullen aan het einde van de experimenten worden opgedood om het effect van de medicijnen op het hersenweefsel te kunnen onderzoeken.</p>					

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

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

De doorbloeding van de hersenen kan op dit moment niet goed genoeg worden nagebootst in modellen waarbij geen levende dieren nodig zijn (in vitro modellen). Het is ook vereist om deze medicijnen op dieren te testen voordat ze bij patiënten worden getest.

### 2. Vermindering

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

Er zullen niet meer dieren worden gebruikt dan het aantal dat minimaal nodig is om betrouwbare uitspraken te kunnen over de werking van de nieuwe medicijnen. Dat aantal wordt berekend op basis van eerdere studies.

### 3. Verfijning

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

Er zullen maatregelen worden genomen voor zo weinig mogelijk pijn en ongerief bij de dieren. Milieuverrijking en sociale huisvesting zullen worden gedaan om het dierenwelzijn te verbeteren. Daarnaast zijn de diermodellen uitgekozen op basis van hun pathologische relevantie (de kenmerken van de dieren passen bij de ziekten die we onderzoeken), hoge reproduceerbaarheid en lage mortaliteit.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Volwassen muizen zijn geselecteerd voor deze studie omdat 1) een herseninfarct en vasculaire dementie goed kunnen worden veroorzaakt; 2) de doorbloeding van de hersenen goed in beeld is te brengen; 3) omdat ze klein zijn, het maakt het mogelijk om de hoeveelheid te gebruiken medicijnen te beperken; 4) er later genetische onderzoek uit te voeren door het maken van muizen die zijn ontworpen om bepaalde genen tot expressie te brengen. Onderzoek naar beroerte en dementie kan wel worden gedaan bij kleine knaagdieren/zoogdieren maar niet niet kan worden uitgevoerd bij ongewervelde dieren of vissen, omdat ze niet dezelfde ziekte krijgen

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-10-2028
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

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

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 18 augustus 2022 10:32  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216338  
**Bijlagen:** PV2022\_002\_5.1 lid2e\_Appendix1\_lvd.pdf; Aanvraag\_5.1 lid2e\_PV2022\_002\_lvd.pdf; PV2022\_002\_5.1 lid2e\_Projectproposal\_lvd.pdf; PV2022\_002\_5.1 lid2e\_NTS\_lvd.xlsx

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion " en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202216338.

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 18-08-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 18-08-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

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

## 5.1 lid2h Advies PV 2022-002- AVD 5.1 lid2h 202216338; 5.1 lid2e

### Preambule

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

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 5.1 lid2h
2. **Titel van het project:** Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion
3. **Titel van de NTS:** Nieuwe medicijnen tegen beroerte en dementie
4. **Type aanvraag:**
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:** 5.1 lid2h, contactpersoon: 5.1 lid2e  
5.1 lid2h, emailadres: 5.1 lid2h
6. **Adviestraject (data dd-mm-jjjj):**

<input checked="" type="checkbox"/> ontvangen door DEC	18.08.2022
<input checked="" type="checkbox"/> aanvraag compleet	18.08.2022
<input checked="" type="checkbox"/> in vergadering besproken	25.08.2022
<input type="checkbox"/> anderszins behandeld	
<input checked="" type="checkbox"/> termijnonderbreking(en)	van 31.08.2022 tot 14.09.2022
<input type="checkbox"/> besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen	
<input checked="" type="checkbox"/> aanpassing aanvraag	14.09.2022
<input checked="" type="checkbox"/> advies aan CCD	27.09.2022
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. **Eventueel horen van aanvrager:** N.v.t.
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
  - **Datum:** 31.08.2022
  - **Gestelde vraag/vragen:** Zie bijlage I
  - **Datum antwoord:** 14.09.2022
  - **Verstrekt(e) antwoord(en):** Zie bijlage I
  - **De antwoorden hebben wel 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. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.** (Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies). JA
- 2. De aanvraag betreft** een nieuwe aanvraag
- 3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?** JA
- 4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.** N.v.t.

## C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het project lijkt de meeste kenmerken te hebben van voorbeeld 3A uit de Handreiking 'Invulling definitie project'. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De 5.1 lid2h vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de 5.1 lid2h van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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

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

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

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek; de onderzoekers willen vooral de fysiologische (in gezonde dieren) en pathologische relevantie (in dieren met herseninfarct of vasculaire dementie) van intracellulaire signaalwegen voor de regulatie van de cerebrale bloedstroom bestuderen.

## **Belangen en waarden**

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

Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden voor herseninfarct en vasculaire dementie. Het betreft hier een fundamenteel project.

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

De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen op dit moment beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden bij herseninfarct en vasculaire dementie en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. De 5.1 lid2h is van mening dat het directe doel 'het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie' gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie zijn de proefdieren, de onderzoekers, de farmaceutische industrie en patiënten.

### **Waarden die voor proefdieren in het geding zijn:**

De fundamentele waarde van leven zal de dieren in het kader van voorgesteld onderzoek ontnomen worden. Daarnaast zullen de dieren aangetast worden in hun integriteit en mogelijkheid tot uitoefening van soorteigen gedrag door de experimentele handelingen (o.a. bilaterale carotide arterie stenose (BCAS) of distale middelste cerebrale arterie occlusie (dMCAO), neurologische testen, vaatcannulatie, bloedflow metingen, toediening (orale gavage of via drinkwater) van farmaca, subcutane injecties, het aanbrengen van een osmotische minipomp, bloedafnames, en intraveneuze injecties) en het leven met de gevolgen daarvan, waaronder het ondervinden van (matig tot ernstig) ongerief gedurende de proeven.

### **Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden:**

De onderzoekers zullen kennis verkrijgen over mechanismen die relevant zijn bij de bescherming tegen cerebrovasculaire ziekten. Daarover zullen zij publiceren en mogelijk weer nieuwe geldstomen kunnen aanvragen voor verder onderzoek.

### **Waarden die voor de farmaceutische industrie bevorderd worden:**

Met de uitkomsten van dit project zullen farmaceutische bedrijven aanwijzingen krijgen voor het vinden van en verder ontwikkelen van middelen die kunnen leiden tot nieuwe en verbeterde behandeling van cerebrovasculaire aandoeningen en daar uiteindelijk

mogelijk winst mee maken.

**Waarden die voor (toekomstige) patiënten bevorderd worden:**

De behandeling en daarmee de prognose van patiënten in de (sub)acute fase van een herseninfarct en van patiënten met vasculaire dementie zal uiteindelijk mogelijk verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeteren.

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

Voor zover de [5.1 lid2h](#) de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

**Proefopzet en haalbaarheid**

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

Voor zover de [5.1 lid2h](#) kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met farmacologische interventies, proefdiermodellen van cerebrovasculaire aandoeningen, wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Frontiers in Neuroscience, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism en Hypertension Research.

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

De [5.1 lid2h](#) is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de [5.1 lid2h](#) leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

**Welzijn dieren**

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

Niet van toepassing.

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

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

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

De 5.1 lid2h acht het ongerief realistisch ingeschat, zoals weergegeven in bijvoorbeeld tabel 1, 2 en 3, met cumulatief 73% matig en 27% ernstig ongerief voor de dieren.

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

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (o.a. bilaterale carotide arterie stenose (BCAS) of distale middelste cerebrale arterie occlusie (dMCAO), neurologische testen, vaatcannulatie, bloedflow metingen, toediening (orale gavage of via drinkwater) van farmaca, subcutane injecties, het aanbrengen van een osmotische minipomp, bloedafnames, en intraveneuze injecties) het leven met de gevolgen daarvan, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden. Hierdoor zullen de dieren slechts beperkt natuurlijk gedrag kunnen vertonen.

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage van 5% voor de dieren in de sham groepen, en 15% voor de dieren in de BCAS en dMCOA groepen dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

**3V's**

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

De 5.1 lid2h is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

**15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er**

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

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

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

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

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

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

***Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef***

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

De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren.

De 5.1 lid2h is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken het noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager aangetoond dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een grotere variatie en dat dan er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager, want de dieren worden gedood in het kader van de proef voor nader onderzoek van met name het hersenweefsel.

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

Niet van toepassing.

***NTS***

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

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

## D. Ethische afweging

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

Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?

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

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

- Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel
- Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.
- Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.
- Waarden die voor (toekomstige) patiënten bevorderd worden: substantieel voordeel.

De [5.1 lid2h](#) is van mening dat de belangen van personen met cerebrovasculaire aandoeningen als herseninfarct en vasculaire dementie en hun naasten in het bijzonder, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, binnen het project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig tot ernstig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (o.a. bilaterale carotide arterie stenose (BCAS) of distale middelste cerebrale arterie occlusie (dMCAO), neurologische testen, vaatkannulatie, bloedflow metingen, toediening (orale gavage of via drinkwater) van farmaca, subcutane injecties, het aanbrengen van een osmotische minipomp, bloedafnames, en intraveneuze injecties) het leven met de gevolgen daarvan, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en aan het eind ervan worden opgeofferd.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verbeteren van de behandeling van vormen van herseninfarct (2<sup>e</sup> vaakst voorkomende doodsoorzaak in 2019) en vasculaire dementie (ca 16 miljoen mensen wereldwijd) waarbij de kwaliteit van leven voor de patiënten ernstig wordt aangetast en de prognose momenteel ongunstig is. Het gaat hier om grote groepen patiënten. Vanwege het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, zal het project echter niet op korte termijn bijdragen aan effectievere behandeling van

herseneninfarcten. Dit laatste is van vele factoren afhankelijk die in deze fase niet te over- en voorzien zijn.

Dit onderzoek biedt perspectief op meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding en strikte toepassing van humane eindpunten, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

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

De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag "Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?" bevestigend.

De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening weegt het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van uiteindelijk patiënten die leiden aan cerebrovasculaire aandoeningen, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken. Er zijn voldoende *go/no-go* momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.



Op grond van deze overwegingen beschouwt de meerderheid van de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" als ethisch gerechtvaardigd. Eén lid is echter van mening dat de validiteit van voorgesteld onderzoek in relatie tot het doel beperkt is en dat dit in combinatie met het ernstige ongerief en de fundamentele doelstelling van het onderzoek ervoor zorgt dat de proportionaliteit van voorgesteld onderzoek in het geding is.

Op basis van de mening van de meerderheid voorziet de **5.1 lid2h** het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" van een positief advies.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden:
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.**
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist**
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...**
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...**
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...**
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...**

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

Het uitgebrachte **5.1 lid2h** advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid is van mening dat het onderhavige onderzoeksvoorstel voorzien zou moeten worden van een negatief advies, omdat deze de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel trekt, de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide vindt, en het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk vindt.

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

- 27% van de dieren zal ernstig ongerief ondervinden, wat een ethisch discussiepunt is binnen een fundamenteel onderzoeksproject.
- De translatie naar de menselijke context in relatie tot de constructvaliditeit van het model voor herseninfarct.
- Er worden slechts dieren van één sekse gebruikt, omdat er nooit is gewerkt met (ge-ovariotomeerde) vrouwelijke muizen bij het toepassen van BCAS en dMCAO. Daardoor zouden de modellen eerst gevalideerd moeten worden bij gebruik van vrouwelijke muizen, wat een studie en expertise op zich is, die de onderzoekers aangeven niet in huis te hebben.

## Bijlage I:

Vragen 5.1 lid2h d.d. 31.08.2022 en Antwoorden VO 14.09.2022

### 5.1 lid2h

**1.** Waarom weegt voor de onderzoeker cq. onderzoeksgroep het belang van het voorgestelde project zwaarder dan het [kies wat van toepassing is] ongerief en/of de schending van integriteit en/of de beëindiging van het leven dat de proefdieren wordt aangedaan?

Why weighs for the researcher cq. research group the importance of the proposed project outweighs the [choose as appropriate] discomfort and/or the violation of integrity and/or the termination of life inflicted on the laboratory animals?

Taking into consideration the major burden caused by stroke and dementia on our societies (see 3.1 Background section), we consider this largely outweighs the moderate to severe discomfort experienced by the animals, their violation of integrity and the termination of their life, as detailed in our proposal. Stroke is the second most common cause of death and the third most common cause of disability worldwide and a major risk factor for cognitive impairment and dementia. In addition, ~10 million people suffer from dementia worldwide: beyond the patients themselves, this also negatively impacts their families, our healthcare systems and the worldwide economy. Furthermore, this impact is expected to increase with the ageing of the population. Our study will bring new insights into the function and relevance of signalling pathways for the regulation of cerebral blood flow in stroke and dementia. This fundamental research is a first step towards the testing of corresponding drugs in stroke and/or vascular dementia patients.

Text (in gray) has been added to the section 3.3.2 under society/patients to further support our view on this question.

**2.** Ernstig ongerief wordt verwacht bij 27% van de dieren <-> bij fundamenteel onderzoek geeft dit problemen ten aanzien van de proportionaliteit van het ongerief voor de dieren ten opzichte van het belang van het onderzoek. Is deze aanvraag wel fundamenteel onderzoek en niet (ook) translationeel onderzoek?

Serious discomfort is expected in 27% of the animals. <-> in fundamental research this causes problems with regard to the proportionality of the discomfort for the animals in relation to the importance of the research. Is this application fundamental research and not (also) translational research?

Our animal research proposal is fundamental as we aim to assess the physiological (in healthy animals) and pathological relevance (in diseased animals) of signaling pathways for the regulation of cerebral blood flow. It does not include other functional readouts to translate our findings to the human condition (e.g. cognitive behavior). Due to the nature of the pathology studied (stroke and dementia), the discomfort experienced by some animals can indeed be considered as severe as described in the corresponding Table of the application file.

### 3.1 Achtergrond | Background

**3.** Phosphodiesterase (PDE) inhibitoren grijpen ook in op NO-cGMP signaling en zijn reeds getest in de door u geschetste context (blood flow-stroke-cognitie-dementie), onder meer door leden van uw projectteam. En met succes, zo blijkt uit een systematic review van een aantal jaar terug (zie o.a. PMID: 29256324). Een korte uiteenzetting van de bevindingen op dat gebied (NO-cGMP/cAMP signaling, blood flow, cognitie/dementie, etcetera) tot dusver zou van toegevoegde waarde zijn. De **5.1 lid2h** vraagt zich tevens af waarom de door u voorgestelde interventies beter geschikt zouden zijn?

Phosphodiesterase (PDE) inhibitors also intervene in NO-cGMP signaling and have already been tested in the context you have outlined (blood flow-stroke-cognition-dementia), including by members of your project team. And with success, according to a systematic review from a few years ago (see, among others, PMID: 29256324). A brief explanation of the findings in this area (NO-cGMP/cAMP signaling, blood flow, cognition/dementia, etc.) so far would be of added value. **5.1 lid2h** also wonders why the interventions you propose would be more suitable?

Indeed, PDE inhibitors were already tested for cerebrovascular effects. However, here it is important to make a distinction between cAMP and cGMP signaling and their corresponding classes of PDEs. There are 11 classes of PDE gene families, of which 4, 7 and 8 are cAMP specific and 5, 6 and 9 are cGMP specific. The others can hydrolyze both cAMP and cGMP. This means that we have a distinction between both (I) cAMP and cGMP, and between (II) the different PDE gene families.

For cAMP signaling, the 'cerebrovascular field' mostly focusses on stroke (see recent review PMID: 34206420, and the clinical study Rostmema <https://rostmema.nl> as examples). However, stroke is only one of the possible causes of VaD. Hence, in our project proposal we separated the pathological mechanisms into large vessel disease (stroke) and small vessel disease.

In the systematic review referenced by you, the effects of PDE5 (cGMP-specific) in SVD are specifically highlighted. It is important to realize that the development of PDE5 inhibitors as cognitive enhancers was terminated because of the reduced expression of PDE5 found in the brains of elderly. Additionally, evidence is accumulating for the role of NO-sGC-cGMP signaling in small vessel disease (PMID: 26988697; 21196259; 30309226). This creates another important distinction based on cGMP production: cGMP can not only be produced by sGC but also by pGC. While sGC is stimulated by NO, pGC functions independently of NO. Thus, the pGC-derived cGMP pool is independent from the sGC-derived cGMP pool, i.e. it is not dependent on eNOS activity. In our proposal, endothelial dysfunction is one of the main players within our hypothesis. However, if we administer a cGMP-specific PDE inhibitor, we cannot control which pool of cGMP we are affecting. By making use of sGC stimulators/activators we can (partially) circumvent this 'cGMP pool' compartmentalization and target the correct mechanism specifically.

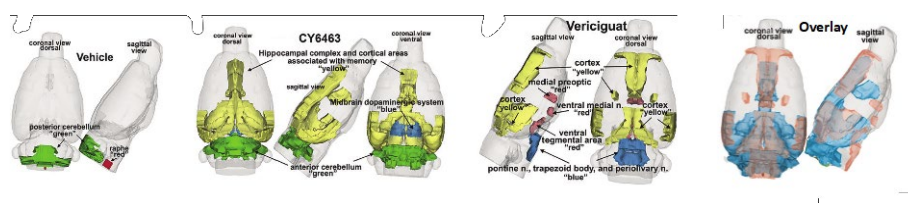
I do understand the expert opinion of the DEC to have an explanation and comparison with the research on PDE inhibitors in the context of dementia (see above). I do think however that adding this background information in the project proposal would add a lot of confusion for a non-expert audience, and I suggest to keep this background information in this reply letter solely.

**4.** Er is een aanzienlijke hoeveelheid bewijs dat compounds die NO-cGMP/cAMP signaling targeten pro-cognitieve effecten hebben effecten los van blood flow. De **5.1 lid2h** vraagt u in deze context duidelijker aan te geven wat de huidige benadering toevoegt aan het veld in bredere zin?

Field Code Changed

There is considerable evidence that compounds targeting NO-cGMP/cAMP signaling have pro-cognitive effects beyond blood flow. In this context, 5.1 lid2h asks you to indicate more clearly what the current approach adds to the field in a broader sense?

This is also correct and we have added text below in the proposal in gray to clarify it. For this, we would like to focus on NO-cGMP signaling, since cAMP signaling is unrelated to our hypothesis (eNOS-NO-sGC-cGMP). Recent research has shown that stimulating sGC with riociguat or vericiguat, both sGC stimulators which do not penetrate the BBB, are able to improve memory in rodents. This seems to be derived from an effect on the microvasculature, although this still has to be conclusively proven (PMID: 34440254; PMID: 35985509). This is one of the hypotheses our project will be able to answer. Additionally, the fMRI-BOLD signal of vericiguat was recently compared to a brain-penetrant sGC stimulator, which seems to suggest there are both vascular and neuronal components to the effects of sGC stimulation (figure 1).



Figuur 1: The different fMRI-BOLD signals measured after treatment with vehicle, brain-penetrant sGC stimulator CY6463 and non-penetrant sGC stimulator vericiguat. The overlay of these signals shows that specific direct neuronal (light blue overlay) and vascular (pink overlay) components may be involved in the fMRI effects of sGC stimulators. Image is adapted from PMID: 34108877.

Our current approach is based on a dual component of brain-penetrant sGC stimulators/activators. We expect both a vascular component (e.g. via the vascular component to NVC) and a neuronal component. Indeed, research in 5.1 lid2h has shown that brain-penetrant sGC stimulators and activators can have specific neuronal effects 5.1 lid2h. Ideally, our experiments will show either a synergistic or additive effect of both the vascular and neuronal components of brain-penetrant sGC stimulation/activation. Of note, even if only a neuronal or vascular component can be found, we may still be able to treat VaD.

5. U geeft aan dat AT1R biased agonists van waarde bleken voor wat betreft cardio-pulmonale systemische effecten bij de hond, maar dat 'yet their impact on cerebral perfusion remains to be investigated'. Ook ten aanzien van sGC stimulators and activators geeft u aan dat 'this drug class is being tested for pulmonary hypertension and heart failure but investigations at the cerebrovascular level to preserve cerebral blood flow are lacking'. Het voorgaande vooronderstelt *in vitro/ ex vivo* onderzoek middels cerebrale capillairen in een orgaanbadje (bv. myografie) als logisch vooronderzoek. Zijn er *in vitro/ex vivo* resultaten bekend over het mogelijks succes van farmacologische interventies als cerebrovasculaire behandeling?

You indicate that AT1R biased agonists proved to be of value with regard to cardio-pulmonary systemic effects in the dog, but that 'yet their impact on cerebral perfusion remains to be investigated'. Also with regard to sGC stimulators and activators you indicate that 'this drug class is being tested for pulmonary hypertension and heart failure but investigations at the cerebrovascular level to preserve cerebral blood flow are lacking'. The foregoing presupposes *in vitro/ex vivo* investigation by means of cerebral capillaries in an organ bath (eg myography) as a logical preliminary investigation. Are there *in vitro/ex vivo*

results known about the possible success of pharmacological interventions such as cerebrovascular treatment?

We conducted preliminary in vitro and ex vivo vessel assays. First, we have tested and are still testing compounds in HEK cells overexpressing the AT1 receptor. As expected, the results show 1) an inactivation of the G protein pathway by calcium assays in the presence of the AT1R biased agonist TRV027 (10<sup>-12</sup> to 10<sup>-6</sup>M) and 2) an activation of the  $\beta$ -arrestins 1 and 2 pathway by Bioluminescence Resonance Energy Transfer techniques. Second, regarding the cerebrovascular treatment, we conducted preliminary assays on isolated perfused rat middle cerebral arteries. As expected, no contraction of the artery was observed by concentration response curves in the presence of TRV027 in contrast to Angiotensin II (10<sup>-12</sup> to 10<sup>-6</sup> M) (Unpublished results). These are promising results that need further validation in vivo.

**6.** Kan er worden aangenomen dat farmacologische interventies die succesvol zijn als cardiovasculaire behandeling, ook succesvol zullen zijn als cerebrovasculaire behandeling? Is het vatenstelsel overall in het lichaam vergelijkbaar?

Can it be assumed that pharmacological interventions that are successful as cardiovascular treatment will also be successful as cerebrovascular treatment? Is the vascular system similar throughout the body?

While cardiovascular and cerebrovascular diseases share many risk factors (e.g. ageing, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, obesity, smoking) and are often interconnected, the organ vasculature differ a lot based on their respective function (e.g. vascular permeability in kidney vs brain) and can be differentially impacted due to e.g. their hemodynamic differences, organ-specific features as well as the expression levels of the targeted ligands or receptors (see e.g. protein atlases). Therefore, we cannot assume unfortunately that a target is automatically relevant for diverse cardio/cerebrovascular disorders if successful for one clinical indication.

### 3.2 Doel | Purpose

**7.** Zou u duidelijker kunnen maken dat de doelstelling (stroke) specifiek gericht is op interventies in sub- en post-acute fase (zoals aangegeven bij kopje Belang), indien dit zo is?

Could you clarify that the objective (stroke) is specifically aimed at interventions in the sub- and post-acute phase (as indicated under the heading Importance), if so?

See also question 15 and the corresponding reply. We have indicated the exact therapeutic windows of our so-called "acute" and "chronic" studies, being 3 days and 7 days respectively after the induction of stroke. We are not aiming for long-term treatments (>7 days) and we propose to use the term "post-acute" phase as suggested by the DEC. This has been adjusted accordingly in gray:

e.g. in 3.2.1 :

"The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke (post-acute phase) and vascular dementia.

We will specifically assess the ability of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and in the post-acute phase of ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions."

### 3.3. Belang | Relevance

8. Welke andere modellen heeft u overwogen en via welke criteria bent u uitgekomen op de beschreven modellen?

What other models did you consider and what criteria did you use to arrive at the described models?

For both models, the main criteria were described in the proposal and were: "their pathological relevance, reproducibility and low mortality" as well as the local expertise to perform the corresponding surgeries.

From the proposal:

Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO): this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS): this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion Stroke 2004).

Addition to the proposal: For the ischemic stroke model, the permanent MCAO ligation model was first considered instead of the distal MCAO electrocoagulation model due to previous experience with this model at UM but the dMCAO model was preferred due to its high reproducibility (resulting cortical infarct volume) and high success rate achieved by local expert. For the vascular dementia model: apart from the chosen BCAS model, Angiotensin II induced hypertensive mice were also considered (also past experience) but BCAS was favored due to its immediate impact on CBF.

9. Kunt u verduidelijken wat de (negatieve) impact van dit voorstel is op de dieren?

Can you clarify what the (negative) impact of this proposal is on the animals?

The negative impact for animals is reflected in the tables in section F displaying the overall estimated discomfort level per procedure and animal groups. Every procedure ranges from mild to moderate and severe discomfort. A cumulative discomfort is being estimated per animal in the Appendix. Additionally a list of possible adverse effects on the animals' welfare is also present in section D.

### 3.4 Strategie | Strategy

#### 3.4.1 Overzicht algemene projectopzet | Overall design project strategy

**10. Worden er 3 compounds per klasse (AT1R agonist and sGC stimulatoren/activators) getest of 3 compounds in totaal (figuur en tekst lijken niet overeen te stemmen)? Indien optie 2: welke klasse omvat de 3<sup>de</sup> compound en waarom? Op basis van welke selectiecriteria kiest u voor de drie middelen die u wilt gaan gebruiken?**

Are 3 compounds per class (AT1R agonist and sGC stimulators/activators) tested or 3 compounds in total (figure and text seem to be mismatched)? If option 2: which class includes the 3rd compound and why? On the basis of which selection criteria do you choose the three resources you want to use?

Yes, a maximum of 3 compounds might be tested per drug class – see corresponding tables in Appendix where all groups and number of compounds are inventorized. This number is mainly capacity-driven and linked to the project duration (5 years)(see also question 39 and reply). We will select the compounds based on their demonstrated effects (either from our own studies and/or based on publication records). The selection of the compounds will be substantiated in the corresponding working protocols. Example: For AT1R biased agonism, there are three main studied compounds found in the literature TRV027 (or TRV120027), TRV023 and TRV056 (PMID 33985815; PMID: 30639099; 34201646). However only TRV027 has been studied in clinical trials for heart failure (NCT01187836) and kidney disease (NCT01444872) and will be therefore the first AT1R biased agonist to be studied in vivo. Furthermore, we are also studying its role in vitro and ex vivo using isolated vessels (see answer to question 5), thereby adding supporting evidence for its testing in vivo.

**11. Wat is de reden dat u de middelen ook wilt testen in gezonde controledieren, terwijl u niet per definitie een effect verwacht bij gezonde dieren en daarnaast een sham-groep heeft voor beide modellen en dit niet als go/no-go moment fungeert om de stof te testen in ziektemodellen? Zou u eventueel de dieren vóór de inductie van de ziekten ook kunnen gebruiken voor het testen van de impact van het middel op de cerebrale bloedstroom?**

What is the reason that you also want to test the agents in healthy control animals, while you do not necessarily expect an effect in healthy animals and also have a sham group for both models and this does not act as a go/no-go moment to test the substance in disease models?

Could you possibly also use the animals before the induction of the diseases to test the impact of the drug on cerebral blood flow?

Since the goal of our study is to assess the ability of AT<sub>1</sub>R biased agonists (Aim 1) and sGC stimulators/activators (Aim 2) to regulate cerebral blood flow in physiological and pathological conditions, it requires the use of healthy animals (for physiological conditions) and disease models (for pathological conditions). The reason why we want to test compounds in physiological conditions is to gain insights into the function of the targeted signalling pathways (fundamental research). For example, if a compound has no effect in healthy animals but has some efficacy in diseased models, it can be useful to understand why a specific pathway is not effective in pathological conditions (e.g. downregulation of the target in pathological conditions).

This is also indicated in Appendix 1, section B: "The presence of an effect in healthy mice is not a pre-requisite for the study of the corresponding compound in diseased models. Indeed, a compound might not increase the cerebral blood flow in mice with physiological values while it might however still prove to be beneficial in diseased models where the flow is reduced."



Regarding the possible use of healthy mice for testing compounds prior to surgeries, two main reasons are refraining us to apply this strategy. Firstly, while this might seem to be a strategy to reduce the number of animals, this would introduce possible bias in between the studies even if proper wash out periods are respected as we have no indication on long-term impact of the therapeutic strategies on the cerebral and systemic circulation. We think it is best to avoid any possible cofounding factors in animal studies. Secondly, this would significantly lengthen the total protocol duration for individual mice: mice will stay in experiment longer, exposed to multiple imaging sessions and recovery periods, increasing overall the total cumulative discomfort per mouse. Additionally, this would make the surgery and recovery more complicated, as we would have to perform chronic vascular catheter implantation for the measurement of the blood pressure and injection of compounds, likely increasing also the drop-out rate.

**12. In hoeverre geven de voorgestelde modellen een betrouwbaar beeld van de pathologie bij mensen? Zijn het puur de occlusies van bloedvaten die zorgen voor het pathologisch fenotype, of gaat er vaak al een pathologie aan vooraf die ook al een effect heeft op de bloedvaten? Met andere woorden: in hoeverre verwacht u dat de resultaten met deze modellen direct en valide vertaalbaar zijn naar de mens?**

To what extent do the proposed models provide a reliable picture of pathology in humans? Is it purely the occlusions of blood vessels that cause the pathological phenotype, or is it often preceded by a pathology that also has an effect on the blood vessels? In other words: to what extent do you expect the results with these models to be directly and validly translatable to humans?

The chosen models are artificially induced to mimic different levels and types of cerebral hypoperfusion. The studied pathological conditions are often associated with risk factors (ageing, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, obesity, smoking...) that are not present in our models. Like always, a combination of animal models is useful for the translation of fundamental/pre-clinical studies. We have chosen these models for their direct, reproducibile impact on the main readout parameter: cerebral blood flow. In models where pathologies are risk factors driven, we can expect a higher variability in the impairment of the cerebral blood flow similar to the patient's heterogeneity which may require then a higher group size. As for now, since this project's aim is focused on cerebral blood flow, it is more suitable to select models in which CBF is directly impacted. It might be that some of the compounds/pathways, even if beneficial in our selected models, will be inefficient in other models. This limited translation is normal for any fundamental research project. By disseminating our findings, we hope that follow-up studies will be carried by other groups using other models which will ultimately validate or not our findings.

**13. Er bestaat een aanzienlijke hoeveelheid kennis over acute en chronische behandelingen met compounds (denk aan PDE inhibitoren) die NO-cGMP/cAMP signaling targeten in het kader van bijvoorbeeld stroke en cognitie/dementie. De 5.1 lid2h vraagt u in deze context duidelijker aan te geven waarom u per definitie beide wegen (acuut/chronisch) wil bewandelen?**

There is a considerable amount of knowledge about acute and chronic treatments with compounds (such as PDE inhibitors) that target NO-cGMP/cAMP signaling in the context of, for example, stroke and cognition/dementia. In this context, 5.1 lid2h asks you to indicate more clearly why you by definition want to take both paths (acute/chronic)?

Understandable question. We would like to emphasize the difference between PDE inhibitors and sGC stimulators/activators. By using PDE inhibitors, we are not specifically targeting eNOS-NO-sGC-cGMP pathological processes, and we cannot even be specific for sGC-derived cGMP.

Additionally, it is important to make a distinction between sGC stimulators and activators. This is based on the theory of sGC dysfunction. Due to endothelial dysfunction, eNOS uncoupling can occur. This shifts the production from NO toward O<sub>2</sub><sup>-</sup>. O<sub>2</sub><sup>-</sup> itself can subsequently react with NO to produce the highly reactive ONOO<sup>-</sup>. This creates a dual problem: (I) reduced bioavailability of NO, and (II) high levels of oxidative stress. The reduced bioavailability of NO results in a reduced stimulation of sGC. Simultaneously, ONOO<sup>-</sup> can oxidize sGC, which prevents sGC from interacting with NO. This means there is not only fewer NO present to stimulate sGC-cGMP production, but sGC also loses its ability to be stimulated by NO.

sGC stimulators act similar to NO: they can enhance the sensitivity of sGC to NO, and can also act as a surrogate for NO. In contrast, sGC activators specifically target the oxidized sGC to restore its activity. These are two separate strategies that can both restore cGMP production. Currently, very little is known about the neuronal effects of sGC stimulators/activators in general, and about the effects of stimulators versus activators in particular. Understanding these effects can have important implications for choosing a treatment strategy. Therefore, it is important to investigate the effects of treatment timing and duration. For example, it could be possible that an activator would be more beneficial as an acute treatment for stroke, whereas a stimulator would be better suited as a chronic treatment for VaD. Indeed, this could also mean that a dual treatment strategy using both a stimulator and an activator is preferred. However, for this project proposal that hypothesis is premature, since we first need to understand the individual effects to draw any conclusions at all.

**14. Zijn de werkmechanismen van de te testen medicijnklassen complementair? Bestaat de mogelijkheid dat een combinatie van de medicijnen een synergistisch effect vertoont?**

Are the working mechanisms of the drug classes to be tested complementary? Is there a possibility that a combination of the drugs may exhibit a synergistic effect?

Yes, this is a very good point. That might be the case but it is too early at this stage to assess a complementary effect. We first have to investigate the mechanisms separately. Only later, towards the end of the present project license, if the separate mechanisms are successful, a combination could be considered as part of a new animal project.

**15. Wordt met acute fase hier <6h of sub-acuut (>6h) bedoeld?**

Does the acute phase here mean <6h or sub-acute (>6h)?

We have clarified the meaning of acute phase in the project proposal. The definition of the acute time window differs between the models as specified in the Appendix 1, Tables 2 and 3. We have further specified it for clarity in the proposal.

See changes in gray in 3.4.1:

The time windows for acute and chronic treatments are specified in 3.4.2 under the description of the animal models.

See changes in gray in 3.4.2:

dMCAO model:

acute timepoint: max 3 days after the induction of stroke;

chronic timepoint: max 7 days after stroke.

BCAS model:

acute timepoint: max 7 days after the induction of cerebral hypoperfusion;  
chronic timepoint: max 3 weeks after the induction of cerebral hypoperfusion.

**16. Worden compounds nu wel of niet in beide ziektemodellen onderzocht (ene keer AND, andere keer may be studied in both models)? Worden er per ziektemodel andere compounds onderzocht?**

Are compounds studied in both disease models or not (sometimes AND, other times may be studied in both models)? Are other compounds investigated for each disease model?

We aim to test the compounds in both models but not at the same time. If a compound has some efficacy in one model, it does not mean it will also be effective in the other model or vice versa.

**17. Is het noodzakelijk om tPA als positieve controle mee te nemen in bv de acute fase?**

Is it necessary to take tPA as positive control to include in eg the acute phase?

The present project remains a fundamental project aiming at studying the role of two signaling pathways on the regulation of the cerebral blood flow in health and disease. At this stage, this research remains fundamental/ not translational and we don't need to compare our treatment groups vs tPA. Furthermore our therapeutic strategy differs from tPA (increasing CBF by regulating vascular tone vs breakdown of clot) and our disease models do not include thrombosis formation.

**18. In een Nota Bene merkt u op dat Angiotensin II toegediend moet worden. Kunt u nader uitleggen waarom dit noodzakelijk is?**

In a Nota Bene you note that Angiotensin II must be administered. Can you explain in more detail why this is necessary?

For the study of AT1R biased agonists, it would be useful to assess the impact of the compounds on the AngII response induced by AT1R stimulation: we expect to observe an acute decrease in CBF after AngII injection subsequent to the AT1R-mediated vasoconstriction (mimicking the AngII release during stroke) and we expect to observe an attenuation of this CBF decrease upon treatment with an AT1R biased agonist due to the beta-arrestin mediated internalization of the AT1R. This explanation has been added to the Project proposal.

## Appendix 1

### 19. Valt het te overwegen allereerst slechts in één model, i.e. het "Middle Cerebral Artery Occlusion" model, te testen en dan alleen bij succes dezelfde compound ook in het andere model te hanteren?

Should it be considered first of all to test only one model, i.e. the "Middle Cerebral Artery Occlusion" model, and then only use the same compound in the other model if it is successful?

We aim to test the compounds in both models but not at the same time. If a compound has some efficacy in one model, it does not mean it will also be effective in the other model or vice versa as the pathological conditions are different.

### 20. Waarom neemt u niet meteen één-of-meerdere cognitieve taken mee in uw onderzoekspzet, bijvoorbeeld in het geval u positieve effecten van een compound op CBF vindt en om het vasculaire dementie-model te valideren voordat u overgaat op behandeling?

Why not include one or more cognitive tasks in your research design right away, for example in case you find positive effects of a compound on CBF and to validate the vascular dementia model before proceeding to treatment?

This is a very relevant suggestion that we have considered to integrate in our experimental design. However, we have decided to focus our research question on the regulation of the cerebral blood flow. Apart from the CBF which is the main readout parameter, we will still be able to perform ex vivo experiments (brain immunohistochemistry) to study possible cerebroprotective effects. Integrating cognitive tasks in such imaging experiments is not possible for all timepoints (e.g. acute): indeed, all animals should be tested in the same timeframe for consistency which would require to perform all surgeries and CBF imaging in few days maximum which is technically not feasible. We prefer to study and validate compounds in this first study before designing appropriate studies for behavioral testing in a later animal project once a compound will have been selected.

### 21. U schrijft dat "CBF measurement will be performed under conditions to test the cerebrovascular reactivity such as neurovascular coupling". Welke condities bedoelt u dan?

You write that "CBF measurement will be performed under conditions to test the cerebrovascular reactivity such as neurovascular coupling". Which conditions do you mean?

Neurovascular coupling corresponds to the transient change in CBF due to neuronal activity. The study of neurovascular coupling allows to test the normal reactivity of cerebral vessels without the need to inject vasoreactive compounds. In animal studies with mice and rats, neurovascular coupling is studied via the mechanical stimulation (movement) of whiskers upon a certain frequency (5-10Hz) for a short period (usually 20-30 seconds) in lightly sedated animals. The detailed procedure will be submitted at the stage of the working protocol. This is a procedure we have already performed in several mouse and rat studies successfully. I have added this explanation to the project proposal.

## A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters |

Experimental approach and primary outcome parameters

### 22. "A decreased CBF is observed in both, stroke and VaD. This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (focus of Aim 1) as well as from an endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (focus of Aim 2)" Wordt dit ook gezien in deze diermodellen? Of wordt vooral het 'gevolg' (vaatvernaauwing) nagebootst zonder de oorzaak te includeren in het model?

"A decreased CBF is observed in both, stroke and VaD. This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (focus of Aim 1) as well as from an endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (focus of Aim 2)" Is this also seen in these animal models? Or is it mainly the 'effect' (vasoconstriction) imitated without including the cause in the model?

Yes this is correct. In the proposed models, the CBF decrease is artificially induced by a surgery performed on the middle cerebral arteries (dmCAO) or on the common carotid arteries (BCAS): thus the main CBF decrease is mechanically induced but impaired cerebrovascular reactivity has been also demonstrated in both dmCAO and BCAS models. Apart from the known reduced NO-dependent relaxation in cerebral arteries following ischemia (PMID: [17033691](#) PMID: [31680031](#)), it was shown that dmCAO induce an increase in Angiotensin II - AT<sub>1</sub> receptor-mediated contractility downstream of occlusion (PMID: [23988741](#)). In BCAS, neurovascular coupling (functional hyperemia) has been shown to be decreased in BCAS vs Sham mice upon whisker stimulation (PMID: [35102790](#)) and the myogenic response of cerebral vessels was altered and there was a reduced vasoreactivity to adenosine (PMID: [33410092](#)).

Field Code Changed

### 23. Kunt u in de tabel specificeren welke handelingen 1 dier kan ondergaan? Het is nu niet duidelijk welke handelingen gecombineerd kunnen worden in 1 dier. Daarnaast is niet geheel duidelijk waar u bloed wilt gaan afnemen, en wat de reden is voor vaat-cannulatie. Ook wordt niet overall duration & frequency beschreven.

Can you specify in the table which actions 1 animal can undergo? It is now not clear which actions can be combined in 1 animal. In addition, it is not entirely clear where you want to take blood, and what the reason is for vascular cannulation. Also, duration & frequency are not described everywhere.

- Actions per animal: the exact actions undergone by the animals is detailed in the Tables 1 (healthy mice groups), 2 (Sham/dmCAO groups) and 3 (Sham/BCAS groups) of the section F. In every table, the procedures are listed with their respective discomfort and the number of animals to be used for every aim is detailed. All procedures listed will be performed for the animals from the corresponding tables. We have furthermore tried to list these procedures chronologically as much as possible;
- Blood collection source was not indicated: we have now added the vena saphena as blood collecting source as well as the maximum blood volume that can be collected per week (100 µL; NC3R) See the table "Overview of the proposed animal procedures".
- Reasons for vessel cannulations are indicated in the list of procedures:  
"Vessel cannulation under anesthesia (terminal procedure):"
  - o cannulation of the femoral artery to allow acute blood pressure measurement during the CBF imaging which is of importance to assess the

- acute drug effects on the blood pressure regulation and its possible impact on CBF regulation;
  - cannulation of the carotid artery to allow injection of compounds and the study their acute effects on the CBF
  - cannulation of the jugular vein to allow perfusion of anaesthetics.”
- Duration and frequency in table list of procedures: all frequencies are indicated in the table (right column). We have been asked by the animal welfare body to remove the estimated durations of all procedures. I have corrected it to include them again.

#### 24. Wat is de reden dat u anesthesie via de jugularis wilt gaan toedienen?

What is your reason for wanting to administer jugular anaesthesia?

For the study of CBF, gas anesthesia (isoflurane) has to be avoided because of the vasodilation it induces (thus artificial increase of CBF). Isoflurane anaesthesia will then be initiated to start the surgery and placement of catheters and a relay with i.v. anesthesia will then be done (a 10 min washout period is then needed to return to CBF baseline). Since a catheter will already be placed in the carotids (see Appendix), the access to jugular veins will be facilitated but femoral veins could also be used. An i.v. line will allow a proper maintenance and adjustment of anaesthesia for the duration of the imaging study while the animal will be monitored on the physiological monitoring platform (ECG, HR, breathing rate, temperature, O<sub>2</sub> saturation).

#### 25. U geeft aan dat u groeps groottes gaat baseren op historische data. Wat is de reden dat u die niet hier al includeert? Een n=20 per groep lijkt wat veel? Is de uitval werkelijk gelijk bij beide modellen?

You indicate that you will base group sizes on historical data. What is the reason you don't already include it here? An n=20 per group seems a bit much? Is the dropout really the same for both models?

We wanted to finalize one animal study to have our latest data on the variability of the CBF reactivity in mice. Using our latest data, we can provide a refined group size calculation. N.B.: the group size calculation will also have to be provided at the stage of the working protocol as it needs to be finally validated by our local animal welfare body. Here's our refined group size calculation using G\*Power v3.1.9.6.

F-test (One-way ANOVA fixed effects, a priori group size calculation),

3 groups (e.g. Sham, dMCAO untreated, dMCAO treated),

$\alpha = 0,05$ ;  $\beta = 0,20$ , power = 0,80

Latest CBF reactivity value from control group (WP 2018-016-009 - 5.1 lid2h )

m=15,59% SD=3,2%, cv=20,5%

Desired effect size = 13%, thus effect size  $f = 0,796$ ;

Total sample size (for 3 groups) = 30, So n=10/group.

Based on a previous study (WP2017-001-005; AVD 5.1 lid2h ), the dropout rate is estimated to 10% in Sham (and healthy control) groups (5% dropout for unexpected reason + 5% for surgical complications or reaching humane endpoints), while it is 20% for the diseased models (BCAS, dMCAO) (5% dropout for unexpected reason + 15% for surgical complications or reaching humane endpoints)

Therefore the final group size calculation is:

Sham, Control  $\rightarrow n(\text{final}) = 10 * 1,10 = 11$  mice/group

BCAS, dMCAO  $\rightarrow n(\text{final}) = 10 * 1,20 = 12$  mice/group

The group size calculation will be performed for every new animal study (for every working protocol) to take into account the latest statistical data (e.g. dropout rate).

We have inserted this calculation in gray in our previous text and we have adapted all corresponding number and tables (total from 1800 to 1038 mice).

**26. Bij CBF measurement is sprake van een “minimally invasive surgical procedure”. Wat behelst deze ingreep precies?**

CBF measurement involves a “minimally invasive surgical procedure”. What exactly does this surgery involve?

We have provided additional information in gray – see text below (Appendix 1). A fully detailed Standard Operating Procedure is additionally available from our previous animal studies. This will be added for the Working protocol.

“CBF measurement and neurovascular coupling: the cortical CBF will be assessed in anaesthetized animals using a laser doppler or speckle contrast imaging technique. This will require a minimally-invasive surgical procedure to image the CBF transcranially. In short, the skin over the skull is retracted with a colibri retractor to allow the visualization of the skull. The Laser Speckle Contrast Imager is then positioned above the skull to image CBF through the skull. CBF measurement will be performed under conditions to test the cerebrovascular reactivity such as neurovascular coupling (e.g. whisker stimulation; injection of drugs) (mild discomfort).

**27. De effecten van compounds die NO-signaling beïnvloeden lijken vaak sterk dosis- afhankelijk. Hoe heeft u het principe van doseringen in uw aanvraag ingepast?**

The effects of compounds that influence NO signaling often appear strongly dose-dependent. How did you incorporate the principle of dosage into your application?

This is indeed important to highlight. While the dose-range is known from previous studies (see answer to question 35), we won't be able to test several doses for every compound and every animal model. We will therefore select a dose based on previous studies (answer question 35). We will only be able to study multiple doses in healthy animals via acute consecutive i.v. injections (dose response curve) to investigate the direct effects of the tested compounds while measuring CBF in physiological conditions. This has been clarified in the text under “Drug treatments” in the list of procedures (see below).

In healthy animals, consecutive increasing doses will be administered i.v. to investigate the direct effects of the tested compounds on CBF in physiological conditions (dose-response curve);

In diseased animal models, a single treatment dose will be selected per compound for the disease animal models based on previous studies (published and unpublished work).

**28. De 5.1 lid2h verzoekt u toe te lichten wat de primaire readout van de studie is en hoe deze wordt gemeten. Dit heeft immers relevantie voor de biometrische bepaling van de geplande aantallen dieren. Het lijkt erop dat het MCAO infarct model een andere readout heeft als het carotis occlusie model.**

The 5.1 lid2h asks you to explain what the primary readout of the study is and how it is measured. After all, this is relevant for the biometric determination of the planned numbers of animals. It seems that the MCAO infarct model has a different readout than the carotid occlusion model.

As indicated in the Appendix 1, section A, the primary outcome parameters for both Aims are the relative cerebral blood flow changes (CBF in %) vs baseline (healthy) or control (Sham) and cerebral blood flow changes mediated by neurovascular coupling (in %). We have clarified how this parameter will be measured, see text in gray: The CBF will be measured by Laser Speckle Contrast Imaging. In brief, this imager measures the blurring effect of a speckle pattern created by the interference of the moving red blood cells within the blood vessels with the coherent light emitted by the device (near-infrared laser light).

**29. U plant de bloeddruk te meten. Dit is de perifere bloeddruk (femorale slagader). Hoe correleert de arteriële bloeddruk in de femorale arterie met de bloeddruk in het CNS en met de cerebrale bloedtoevoer?**

You plan to measure blood pressure. This is the peripheral blood pressure (femoral artery). How does arterial blood pressure in the femoral artery correlate with blood pressure in the CNS and with cerebral blood flow?

We aim to measure blood pressure *"to assess the acute drug effects on the blood pressure regulation and its possible impact on CBF regulation"* (Appendix section A). A possible impact of the tested compounds on blood pressure is of major importance for:

- Knowing if the compounds might impact the blood pressure and thus be a positive or negative side effect of the therapeutic strategy;
- Knowing if the CBF measurement is performed within the normal (physiological) blood pressure range;
- Knowing if the change in CBF observed upon the administration of the tested compound is independent of any blood pressure changes. Indeed, the cerebral circulation benefits from the autoregulation principle. It adapts to maintain CBF constant over a certain range of blood pressure values i.e. CBF should not be altered when blood pressure is decreased or increased until certain physiological limits. However, upon drastic increases and decreases of the blood pressure (e.g. hypertensive crisis; hemorrhage), the CBF will follow the blood pressure passively.

This justification has been added to the Appendix



**30. Kunt u de procedure van de transcraniale meting van de cerebrale bloedflow nog nader toelichten? De beschrijving van BCAS en dMCAO ontbreekt ook in de zin van hoe wordt dit uitgevoerd. Kunt u dit ook toevoegen?**

Could you explain the procedure of the transcranial measurement of cerebral blood flow in more detail? The description of BCAS and dMCAO is also missing in the sense of how this is performed. Can you also add this?

While the detailed standard operating procedures (validated SOPs) will be added and further validated with the working protocol, I have added the following short description to the Appendix in **gray**:

CBF measurement and neurovascular coupling: the cortical CBF will be assessed in anaesthetized animals using a laser doppler or speckle contrast imaging technique. This will require a minimally-invasive surgical procedure to image the CBF transcranially. The CBF will be measured by Laser Speckle Contrast Imaging. In brief, this imager measures the blurring effect of a speckle pattern created by the interference of the moving red blood cells within the blood vessels with the coherent light emitted by the device (near-infrared laser light). CBF measurement will be performed under conditions to test the cerebrovascular reactivity such as neurovascular coupling (e.g. whisker stimulation; injection of drugs) (mild discomfort).

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS): this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. Upon exposure of the carotid arteries, microcoils (0,18 mm internal diameters) will be placed around both common carotid arteries to reduce their diameters (30 min delay between both carotids). The CBF is measured before and after placing the microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm. The animals will be studied for a maximum period of 3 weeks as this is the maximal period with constant CBF reduction and period when structural brain lesions and cognitive decline develop. We will therefore study the impact of acute treatment (1 week, with established CBF reduction but no major lesion) and chronic treatment (3 weeks, CBF reduction with structural lesions). (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion Stroke 2004).

Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO): mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation. In short, a skin incision is made between the ear and eye and the temporal muscle is detached from the skull (muscle flap) to allow the visualization of the MCA branches through the skull. The MCA and its branches are coagulated using electrocoagulation forceps. The resulting infarct is cortical and the relative infarct volume corresponds to the majority of human strokes. The animals will be studied for a maximum period of 1 week as the functional impact in the model is maximal in the first week and possible vascular collateralization can occur after 1 week. This also corresponds to the desired treatment window in stroke patients (first days after stroke). We will therefore study the impact of acute treatment (max 3 days, period in which the ischemic area is expanding and reach its maximum volume) and chronic treatment (1 week, maximum ischemic area). (Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.)

**31. U spreekt van het vormen van collaterale bloedvaten bij langere occlusie van de MCAO. Tevens wordt er gesproken van het onderzoeken van angiogenese (in sectie B, dieren). Is het vormen van collaterale bloedvaten niet wenselijk voor een aantal van uw onderzoeksvragen?**

You speak of the formation of collateral blood vessels with prolonged occlusion of the MCAO. There is also talk of investigating angiogenesis (in section B, animals). Is the formation of collateral blood vessels not desirable for some of your research questions?

It is important to distinguish angiogenesis (formation of new capillaries, sprouting from existing vessels) from arteriogenesis (which is the rapid proliferation of collateral vessels) (see for example review PMID: 25012127). In the present study we want to investigate (ex vivo) if the tested compounds can promote angiogenesis (measurement of capillary density) in the chronic studies. The formation of collateral vessels due to the adaptation of the animal to the hypoxic injury is not an advantage as it may alter the desired phenotype by restoring CBF (we therefore want to avoid longer studies to circumvent this).

**32. Kan de 5.1 lid2h opmaken uit de beschrijving van de primaire uitkomstparameters dat CBF bepaald wordt voor en na BCAS of dMCAO en na interventie? Klopt het aantal keer dat dit gemeten wordt bij het overzicht van de procedures dan wel?**

Can the 5.1 lid2h conclude from the description of the primary outcome parameters that CBF is determined before and after BCAS or dMCAO and after intervention? Is the number of times that this is measured in the overview of the procedures correct?

This is right indeed. CBF is measured during a first imaging session: before and after the surgical interventions to assess the CBF impairment induced in the model at the start of the animal study. In addition CBF is also imaged at the end of the animal study (second imaging session; terminal procedure) to assess the impact of the treatment on CBF and neurovascular coupling. The number of imaging sessions is limited to 2 for the disease models as indicated in the table with the procedures (section A). For the "acute study" with healthy mice groups however, only one terminal imaging session is needed. This has been clarified in the text.

**33. Graag aantallen aanpassen voor bloedafname (1x/week, max 1x for acute, max 3x for chronic study). Hoeveel bloed wordt er afgenomen op wekelijkse basis voor chronische studie? Welke route wordt gebruikt voor bloedafname (aangezien dit aantal keer en hoeveelheid bepaalt)?**

Please adjust numbers for blood sampling (1x/week, max 1x for acute, max 3x for chronic study). How much blood is drawn on a weekly basis for chronic study? Which route is used for blood draw (as this determines number of times and amount)?

This is indicated in the Table section A of the Appendix 1. We have also referred to the maximum volume and frequency of blood collection according to NC3R guidelines.

<https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse#summarysv>

We have adapted the table to clarify this further:

- 1x/week; maximum once for acute study; maximum 3 times for chronic study;
- Maximum volume per week per collection: 100 µL via the vena saphena.
- 

Field Code Changed

**34.U schrijft: "Drug treatment: least invasive route preferred". Is een mini-pomp minder invasief dan dagelijkse sc injectie gedurende 1 week?**

You write: "Drug treatment: least invasive route preferred". Is a mini-pump less invasive than daily sc injection for 1 week?

I agree that this is a difficult and rather subjective assessment. The implantation of osmotic minipump is minimally invasive and is a fast surgical procedure only occurring once. On the other hand, it can be considered more invasive due to the constant presence of a foreign object under the skin. Thus – if limited to one week – we consider that daily SC injections should be preferred. The administration route will be discussed for every working protocol with the animal welfare body to agree on the least invasive route. The dosing and pharmacokinetic properties of the compounds may also largely influence the choice of the administration route. I have therefore rephrased the statement to : "Drug treatment: most suitable route"

**35.Nu wordt pas voor de eerste keer aangehaald dat er een dosis effect wordt onderzocht bij gezonde dieren. Zijn de doseringen van de interventies niet bekend, aangezien deze reeds gebruikt worden bij cardiovasculaire behandelingen?**

Only now is it mentioned for the first time that a dose effect is being investigated in healthy animals. Are the doses of the interventions unknown, as they are already used in cardiovascular treatments?

We will only be able to study multiple doses in healthy animals via acute consecutive i.v. injections (dose response curve) to investigate the direct effects of the tested compounds while measuring CBF in physiological conditions. This has been clarified in the text under "Drug treatments" in the list of procedures (see below).

In healthy animals, consecutive increasing doses will be administered i.v. to investigate the direct effects of the tested compounds on CBF in physiological conditions (dose-response curve);

In diseased animal models, a single treatment dose will be selected per compound for the disease animal models based on previous studies (published and unpublished work).

Several doses will be tested, infused in the healthy animals by performing dose response curves.

For acute and chronic treatments in animal models, the dose will be chosen based on prior studies. For the sGC stimulator/activators, the dose-range is known, but the exact dose is currently still unsure. For example, brain-penetrant sGC activator runcaciguat was preclinically tested for kidney failure, and effective at 10 mg/kg twice a day in rats (PMID: 34550407). In a phase 1 clinical study, runcaciguat was tested at a single dose of 10 mg (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03235076>), translating to 2 mg/kg in mice (PMID: 17942826). For cognitive effects in rodents (mice and rats), a range of 0.1-1 mg/kg acutely was found to be effective (1x/day; PMID 5.1 lid2h ). For the AT1R biased agonists, Boerrigter et al., 2012 infused TRV027 in dogs at 18µg/kg/h over 90 minutes via the femoral vein. In other studies, TRV027 was used to treat mouse and rat models with a similar dose range (20µg/kg/h and 0.02µg/h respectively over a period of 28 days and 14 days respectively) ( PMID: 33249862; PMID: 29903768). TRV027 was also infused at a dose of 1 or 10 mg/kg/day in rats (PMID: 33090352). Hence, we cannot (yet) be conclusive about the optimum dose for all compounds but this will be substantiated in the working protocol with support from the literature and/or other ongoing studies.

Field Code Changed

## B. De dieren | The animals

**36.U geeft aan alleen mannetjes te willen includeren, omdat oestrogenen een beschermend effect hebben op herseninfarct en vasculaire dementie. Maar dat dit beschermende effect wegvalt na de overgang. Sowieso komen vasculaire dementie en herseninfarcten beduidend vaker voor bij ouderen. Bovendien verandert de vaatreactiviteit met de leeftijd, wellicht ook door andere pathologieën. In hoeverre is het dan logisch om met juveniele dieren te werken, zeker met het oog op uiteindelijke transleerbaarheid van de resultaten naar de mens? Door met oudere dieren te werken, kunt u tevens makkelijk ook vrouwelijke dieren includeren.**

**Eventueel zou er wellicht ook gewoon vrouwelijke muizen na ovariectomie besteld kunnen worden en meegenomen in uw experimten? Verder: is het niet denkbaar dat bepaalde compounds wel effecten in vrouwtjes geven maar niet in mannetjes? Met de huidige opzet zult u deze missen aangezien u zegt dat "it has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study." Wat is hierop uw visie? (Zie ook <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0122-1>).**

You indicate that you only want to include males, because estrogens have a protective effect on cerebral infarction and vascular dementia. But that this protective effect disappears after the transition. In any case, vascular dementia and stroke are significantly more common in the elderly. In addition, vascular reactivity changes with age, possibly also due to other pathologies. To what extent is it logical to work with juvenile animals, certainly with a view to the ultimate translatability of the results to humans? By working with older animals, you can also easily include female animals.

Furthermore: is it not conceivable that certain compounds have effects in women? give wts but not in males? With the current setup you will miss it as you say that "it has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study." What is your view on this? (See also <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0122-1>). Possibly, female mice could also be ordered after ovariectomy and included in your experiments?

Field Code Changed

The comments on both the influence of age and sex are of course very valid. There are however major limitations to take into account to be able to answer our research question. Regarding the age factor, it is important to realize that the success rate of the proposed surgeries – and recovery – is known to decrease further in older mice. This is also the experience we have with the BCAS surgery. In older mice, the mortality rate becomes too high (~50%) and it is not considered acceptable, requiring us to perform the surgeries in 10-12 weeks old mice like the other groups. We hope that the results from our studies in adult males will stimulate future animal studies in other models (as indicated in question 12) as well as in older mice when possible.

Regarding the sex factor, we have decided to not include both sexes for the reasons stated in the proposal indeed. The reviewers are right though that some compounds may be protective in female and not in males for example. It may be possible to study the treatments in ovariectomized mice and we have considered it. However both the BCAS and dMCAO models have never been tested in ovariectomized mice and this would require a study by itself. This goes beyond our expertise and technical means. We are fully aware that studying only one sex limits the translational character of our study but we consider it is important to solve fundamental research questions first with an experimental design that limits variables, confounding factors and sources of drop-outs.

See also the answer to the question 12 on human translation of animal models.

**37. U wilt gezonde dieren apart van de dieren in een ziekte model bestuderen, maar includeert ook een "sham groepen" in de ziektemodellen. Geven deze groep niet vrijwel dezelfde informatie als de groep gezonde dieren? Is er voor elke compound werkelijk een niet- behandelde controlegroep nodig? Indien er controlegroepen gecombineerd kunnen worden kan het aantal dieren gereduceerd worden, met name omdat er ook ingrepen met ernstig ongerief gepland zijn.**

You want to study healthy animals separately from the animals in a disease model, but also include "sham groups" in the disease models. Do not this group provide almost the same information as the group of healthy animals? Is there really a need for an untreated control group for each compound? If control groups can be combined, the number of animals can be reduced, especially because interventions with serious discomfort are also planned.

Sham animals will undergo the same surgical procedures than the disease models except that coils won't be placed around the carotids (BCAS model) and that the MCA branches won't be coagulated (dMCAO). It is of major importance to have a Sham group for comparison to the BCAS/dMCAO groups: these are the right control animals, age-matched, who undergo a Sham surgery in the same conditions during the same calendar weeks (to avoid any possible confounding bias). It is therefore not possible to replace the groups of healthy mice as the duration, treatments, and study periods will differ. We can however consider to perform e.g. two different treatments in the same model at the same time which would allow to spare the Sham and untreated disease animals. For example: Sham + untreated BCAS + BCAS with treatment 1 + BCAS with treatment 2. We would ideally prefer to start with one compound only (see question 5) but this strategy could be considered based on the level of evidence/support for the diverse compounds while preparing the working protocol.

**38. Het aantal van n=20 lijkt een erg ruime 1e schatting die hopelijk ingeperkt wordt n.a.v. powerberekening o.b.v. de 1e data. Waarop is deze ruime schatting gebaseerd? U geeft een overlevingspercentage van 80-85% aan bij BCAS. U schat 20% uitval (ook voor de sham groepen) en u geeft 5% indicatie van HEP bij BCAS en 15% bij dMCAO. Hoe verklaart u het verschil in HEP incidentie en uitvals percentages? Waarom hanteert u ook 20% uitval en n=20 in de sham groepen en de gezonde muizen?**

The number of n=20 seems a very broad 1st estimate that hopefully will be limited after power calculations based on the 1st dates. What is this broad estimate based on? You indicate a survival rate of 80-85% with BCAS. You estimate 20% dropout (also for the sham groups) and you give 5% indication of HEP for BCAS and 15% for dMCAO. How do you explain the difference in HEP incidence and dropout rates? Why do you also use 20% dropout and n=20 in the sham groups and the healthy mice?

See detailed answer to question 25 and adjusted values in the Appendix

**39. Met de zinsnede 'The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.' lijkt uw onderzoeksaanvraag meer capaciteits- dan vraaggestuurd. Gezien het feit dat 27% van de dieren naar verwachting ernstig ongerief ondergaat worden de go/no go criteria en onderbouwing van de dieraantallen van eminent belang. Naar de mening van de 5.1 lid2h dienen deze beide aspecten te worden aangescherpt. Als go/no go criterium zou overwogen kunnen worden als uitgangspunt te nemen het effect van het meest veelbelovende farmacon per klasse in plaats van het streven naar het testen van alle beschikbare farmaca per klasse. Graag daarover uw mening.**

With the phrase 'The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.' your research application seems more capacity-driven than demand-driven. Given that 27% of the animals are expected to experience serious discomfort, the go/no go criteria and substantiation of the animal numbers become of eminent importance. In the opinion of 5.1 lid2h, these two aspects should be tightened up. As a go/no go criterion, one could consider taking the effect of the most promising pharmaceutical per class as a starting point, instead of striving to test all available pharmaceuticals per class. Please give your opinion.

We understand the concern of the 5.1 lid2h regarding the proportion of animals with severe discomfort. We would like to highlight that we have adapted the number of animals by refining our group size calculation and dropout rates in Sham mice (1038 mice instead of 1800 mice). In addition, we would like to also remind that the severe discomfort is purely related to the severity of the model (stroke) which is inherent to the project. Furthermore, we plan indeed to start our investigations with the most promising "lead" compounds per class based on previous and ongoing studies (in vitro and/or ex vivo) see previous answers. After analyzing the data obtained with one compound, we will summarize our findings and decide/or not/ to plan the study of another compound in that class in the working protocol that will be assessed by the animal welfare body. The decision to study a second and a third compound per class will not be based on the efficacy of the tested drug (yes/no as a go/no-go criteria) but rather on the information gained with the previous tested compound (e.g. choice of a compound that has a different pharmacokinetic profile or higher brain distribution). We think therefore that it is not possible to assign such go/no-go point as the decision will not be based on a binary criteria/parameter.

**40. Waarom wordt er bij de chronische fase behandeld vs niet-behandeld meegenomen voor gezonde dieren, terwijl dit niet zo is bij de acute fase (lijkt enkel behandeld te worden)?**

Why does the chronic phase include treated vs untreated for healthy animals, while the acute phase does not (seems to be treated only)?

This is right (section B). In the acute study, we aim to study the direct effect of compounds on CBF i.e. the tested drug will be injected i.v. during the imaging session, allowing us to do a dose-response curve experiment. In the chronic study on the other hand, we aim to assess the long-term effect of the treatment on CBF in physiological conditions and assess the CBF before/after this period, therefore requiring a control, untreated group. This was indeed not clearly explained and we have therefore added this explanation in gray in the section "Animals" after the first table.

#### **D. Pijn en welzijnsaantasting | Pain and compromised animal welfare**

##### **41. Welke criteria gebruikt u voor het bepalen van de humane eindpunten? U spreekt over een "risk for possible complications after surgery". Welke complicaties worden er specifiek verwacht?**

41. What criteria do you use to determine the humane endpoints? You talk about a "risk for possible complications after surgery". What complications are specifically expected?

The humane endpoints criteria are described in detail in the section E Humane endpoints and further discussed in the questions and respective replies below. See questions 42 to 46.

Post-surgical complications: the possible complications are listed in the section D. We have added some other possible causes in gray:

"2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, loose suture, poor wound healing, edema formation,...) and a solution will be implemented to avoid future complications.

(NB: this differs from the expected symptoms that are subsequent to the surgically-induced pathologies)

#### **E. Humane Eindpunten | Humane endpoints**

##### **42. Hoelang is 'continued'?**

42. How long is 'continued'?

We have removed "continued" signs of distress and we refer instead to the severity score.

##### **43. Gewichtsverlies van >20% van voor de operatie is bij jonge dieren (die dus nog groeien, ook in gewicht) relatief gezien wat meer dan 20%. Zou het niet beter zijn om te corrigeren voor verwachte groei?**

43. Weight loss of >20% before surgery is relatively more than 20% in young animals (that are still growing, also in weight). Wouldn't it be better to adjust for expected growth?

We are following the current guidelines written by the FELASA working group as recommended by our veterinarian and indicated below and in our proposal:

Humane endpoints in this study will be a strong reduction in body weight according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/ or rehydration, or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.

**44.U geeft hier aan dat er een verschil is tussen het percentage dieren dat mogelijk een humaan eindpunt bereikt tussen de twee modellen. Dit komt niet terug in uw onderbouwing voor de groepsgroottes. Zou u dit met elkaar in overeenstemming kunnen brengen?**

You indicate here that there is a difference between the percentage of animals that may reach a humane endpoint between the two models. This is not reflected in your substantiation for the group sizes. Could you reconcile this?

This is indeed a mistake as we wanted to refer to a difference between the Sham and BCAS or dMCAO groups. It has been corrected as follows:

The expected incidence is low for Sham groups (5%) and moderate for BCAS and dMCAO groups (15%).

**45.Bij het BCAS model wordt ook gebruik gemaakt van de Garcia neurological test. Is de frequentie van deze test (1x per week) wel voldoende om op tijd in te kunnen grijpen bij afwijkingen?**

The BCAS model also uses the Garcia neurological test. Is the frequency of this test (1x per week) sufficient to intervene in time in the event of abnormalities?

Animals will be checked daily and a neurological test will be done on a regular basis: we have adjusted this to 2x/week instead of 1x/week.

**46.In de humane eindpunten wordt aangegeven dat een aantal classificatiesystemen zal worden gebruikt en ten aanzien van de 'the Garcia neurological test lijken die eenduidig. De beschrijving van de humane eindpunten komt wat fluide over en wordt versterkt door de zinsnede 'when the symptom(s) of distress is (are) considered as too many, too severe or lasting too long, then this is considered as a humane endpoint' met drievoudig 'too'. Mutatis mutandis geldt dit ook voor de zinsnede 'The quality of the signs of distress will be documented weekly by trained and experienced team members and minimum daily during critical timepoints of the study (e.g. after surgery).' daar de wet op de dierproeven vooronderstelt dat dieren in experiment dagelijks worden geïnspecteerd en niet alleen gedurende een kritieke periode. Wanneer wordt een humaan eindpunt bereikt (vanaf welke totaal score) in geval van verminderd welzijn? Wat is de drempelscore voor dMCAO die een HEP vereist? Zijn de HEPs voor acute vs chronische fase hetzelfde of verwacht u nog andere mogelijke humane eindpunten bij de dieren binnen de chronische fase?**

The humane endpoints indicate that a number of classification systems will be used and with regard to the Garcia neurological test they seem unambiguous. The description of the humane endpoints seems somewhat fluid and is reinforced by the phrase 'when the symptom(s) of distress is (are) considered as too many, too severe or lasting too long, then this is considered as a humane endpoint' with triple 'too'. Mutatis mutandis, this also applies to the phrase 'The quality of the signs of distress will be documented weekly by trained and experienced team members and minimum daily during critical timepoints of the study (e.g. after surgery).' as the animal testing law presupposes that animals in experiment are inspected daily and not just during a critical period.

When is a humane end point reached (from which total score) in case of reduced well-being? What is the threshold score for dMCAO that requires a HEP? Are the HEPs for acute vs chronic phase the same or do you expect other possible humane endpoints in the animals within the chronic phase?



The 5.1 lid2h is right that animals are inspected daily. In addition to this daily check, a more refined documentation of the signs of discomfort and e.g neurological scoring will be performed using animal welfare score sheet at a high frequency (daily) following the surgery. We aimed to summarize the important criteria considered but understand the possible confusion and we have removed the triple "too" and tried to refer mostly to the animal welfare score and neurological scores as these are more objective assessment of the animal's discomfort.

Different scoring systems have initially been proposed based on different expertise, models and past studies. We agree that this adds confusion. We propose therefore to use the Garcia neurological testing for both BCAS and dMCAO models. We have also further described the standard scoring system for the healthy mice groups as described in gray below and in the proposal:

General considerations – humane endpoints for healthy mice groups:

Humane endpoints will be considered if animals exhibit signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented by trained and experienced team members during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress reach humane endpoints, euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). A cumulative welfare score >6 or one criteria scored 3 will be considered a humane endpoint. Each criteria (awareness, posture, movement, social behavior, fascial expression, coat condition, nest building, breathing pattern) is scored from 0 to 3 (0=normal; 3= severely altered). Furthermore, a strong reduction in body weight will also be considered a humane endpoint according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/ or rehydration, or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted. Procedure/group-dependent considerations for the BCAS/Sham and dMCAO/Sham groups:

After surgery, the Garcia neurological test will be used 2x/week to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>.

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>;
- a Garcia score ≤ 10 (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will be considered a humane endpoint for the BCAS/Sham groups
- a Garcia score ≤ 7 will be considered a humane endpoint for the dMCAO/Sham groups

Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .

Are the HEPs for acute vs chronic phase the same or do you expect other possible humane endpoints in the animals within the chronic phase?

We are not expecting different HEPs for acute and chronic studies. The same scores will apply.

## F. Classificatie van ongerief | Classification of severity of procedures

### 47. Als dieren meerdere handelingen ondergaan met matig ongerief, wanneer wordt het dan ernstig ongerief en wanneer blijft het totale ongerief op matig in het geval van uw voorgestelde experimenten?

If animals undergo multiple acts of moderate distress, when does it become severe distress and when does the overall distress remain moderate in the case of your proposed experiments?

This is a very relevant question that we have carefully considered in the description of our animal studies. We have considered in particular that multiple procedures with prolonged moderate discomfort would qualify for severe discomfort. As such we have limited the number of procedures performed on one animal (by focusing on our main research question and readout parameter) to maintain the discomfort as moderate for all groups except those undergoing stroke.

### 48. Niet alle ander B. beschreven procedures (zoals de Garcia neurological test) komen terug in de tabellen bij de ongerief inschatting. Is het ongerief wel correct ingeschat? Bijvoorbeeld: het plaatsen van een osmotische pomp (is hiervoor ook een chirurgische ingreep nodig?), toedienen van middelen via het drinkwater of via orale gavage geeft niet dezelfde ongeriefscore, maar is niet gedifferentieerd in de tabel; ongerief voor de sham-dMCAo-operatie is matig, maar voor de 'echte' ernstig; Het ongerief van CBF meting + neurovasculair coupling is als non-recovery ingeschat, maar in een eerdere tabel wordt aangegeven dat deze procedure twee keer uitgevoerd kan gaan worden. Hoe is dit mogelijk? Wat is het werkelijke ongerief? Waarom worden subcutane injecties blijkbaar wel voorzien in AIM1 "acute" en niet in AIM1 "chronic" en is dit precies andersom voor acute en chronic bij AIM2 (tabel 3).

Dit gecombineerd met de opmerking in sectie A: "N.B.: not all procedures will be performed in all animals. The different animal studies and the associated estimated cumulative discomforts are listed in the Table section B." Suggereert dat we hier te maken hebben met een soort van keuzemenu waar een experiment uit samengesteld kan worden. Kunt u ook verduidelijken welke combinaties van handelingen 1 dier zou kunnen ondergaan? Het zou bijvoorbeeld helpen om 1) ongeriefscore per procedure aan te geven, 2) elke procedure een nummer te geven en 3) het cumulatief ongerief te bepalen voor elke experimentele groep 1.1 tot 2.12 en hierbij aan te geven welke procedure nummers hierbij van toepassing zijn.

48. Not all other procedures described in B. (such as the Garcia neurological test) are included in the tables in the distress assessment. Has the inconvenience been correctly estimated? For example: placing an osmotic pump (does this also require a surgical procedure?), administering agents via drinking water or via oral gavage does not give the same distress score, but is not differentiated in the table; discomfort for the sham-dMCAo operation is moderate, but for the 'real' severe; The inconvenience of CBF measurement + neurovascular coupling has been estimated as non-recovery, but an earlier table indicates that this procedure can be performed twice. How is this possible? What is the real discomfort? Why are subcutaneous injections apparently provided for in AIM1 "acute" and not in AIM1 "chronic" and is this exactly the other way around for acute and chronic in AIM2 (table 3).

This combined with the comment in section A: "N.B.: not all procedures will be performed in all animals. The different animal studies and the associated estimated cumulative

discomforts are listed in the Table section B." Suggests that we are dealing here with some sort of drop-down menu from which an experiment can be composed. Can you also clarify which combinations of actions 1 animal could undergo? For example, it would help to 1) indicate distress score per procedure, 2) number each procedure and 3) determine the cumulative distress for each experimental group 1.1 to 2.12 and indicate which procedure numbers apply.

- Neurological testing has been added as a procedure
- Assessment of discomfort level: see argumentation in reply to question 47;
- The level of discomfort for drug treatment in water has been adjusted to "mild" while gavage remains a "moderate" discomfort;
- The estimated discomfort for animals undergoing the dMCAO procedure is indeed listed as severe while it remains moderate for the Sham animals – the procedure is more severe due to the coagulation of the MCA and direct reduction in CBF/ischemia;
- CBF measurement + neurovascular coupling: the procedure will be indeed performed indeed maximally twice (start/end of the study). Discomfort has been indeed adjusted to moderate – only the sacrifice is a terminal procedure (and the final CBF measurement will be done before sacrifice);
- subcutaneous injections only for "acute" and not "chronic" studies: we consider that daily sc injections should be limited to 7 days maximum for the animal's welfare + the reviewer was right, there was a mistake in the columns made in one Table, this has been corrected while changing the numbers;
- We have prepared 3 different tables (Section F, Tables 1, 2 and 3) that list the different procedures that animals will undergo for every study and condition. This is to avoid a drop-down menu. In addition, the individual discomfort level is indicated per procedure as well as a cumulative discomfort at the bottom of the tables.

G. Replacement, reduction, refinement | Replacement, reduction, refinement

**G. Vervanging, vermindering, verfijning** | Replacement, reduction, refinement

**49.Vraag Zou u ter vervanging van bv de controledieren ook bijvoorbeeld een fase 0 studie in mensen kunnen doen?**

Question Could you also, for example, do a phase 0 study in humans to replace the control animals?

A phase 0 is aimed at verifying the safety and assessing some pharmacokinetic parameters of a drug but not to solve fundamental research questions. One low, subtherapeutic, dose can be tested in a phase 0 thus limiting the investigations for the study of the regulation of the CBF.

This explanation has been added to the section G "replacement".

**50. "Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents)." ♦ kunt u aangeven wat de reden is dat u niet iets grotere vaten zou kunnen gebruiken in een ex vivo-small vessel myograaf voor het bestuderen van vaatreactiviteit? Of bijvoorbeeld met stukjes vers humaan hersenweefsel?**

"Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents)." Can you indicate why you could not use slightly larger vessels in an ex vivo small vessel myograph to study vascular reactivity? Or, for example, with pieces of fresh human brain tissue?

The reviewer is addressing a major limitation of brain microcirculation research. As stated, we cannot replace the proposed animal work with ex vivo / in vitro solutions, which does not block us to perform these investigations while keeping in mind their major limitations. For example, we are investigating the effect of some compounds on middle cerebral arteries mounted in arteriographs. This is useful to test several compounds at multiple doses, investigate mechanisms but it concerns large vessels (>100 µm) is not very informative for the study of microcirculation (~ 6-10 µm) as the expression of receptors, enzymes, ... differ a lot between vascular beds. Therefore our ex vivo investigations – although useful – can not replace the use of animals for the present project. On the other hand, the use of human material may sound attractive but one should consider the impact of previous medication, history, collection delay, high variability, low group sizes ... as well as human ethical considerations. Therefore, in this context, the use of human material is more of added value to validate key data from animal studies. We have added this justification to the part " Replacement".

**51. Hoe wordt precies invulling gegeven aan het argument voor vermindering? Uit het huidige voorstel blijkt nog niet echt dat er gebruik wordt gemaakt van resultaten uit eerder onderzoek.**

How exactly is the argument for reduction given? The current proposal does not really show that use is made of results from previous research.

This has been corrected – see group size calculation based on our latest CBF study in mice – section A (also reply to question 25).

#### **Bijlage II. Redactionele vragen en opmerkingen**

#### **C. Algemene redactionele vragen/opmerkingen:**

Annex II. Editorial questions and comments

We have addressed and solved the questions and comments directly. Changes are marked in gray.



## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

#### Stroke and Vascular Dementia

Stroke is the second most common cause of death and the third most common cause of disability worldwide (1)(2). In addition, stroke is a major risk factor for cognitive impairment and dementia (3). Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide (4), of which 20% are due to vascular pathology, a.k.a.

vascular dementia (VaD) (3). VaD results from large vessel (stroke) or small vessel diseases (genetic or sporadic forms)(5). The pathological mechanisms of stroke and VaD are both linked to impairment of the cerebral blood flow (Figure 1).

### **Cerebral blood flow and neurovascular coupling**

The brain represents about 2% of the body weight and despite its relatively small size, it accounts for 20% of the oxygen and energy consumed by the body. (6). Since the brain is not designed to store energy, it relies on a dense vascular network to meet its high metabolic demand. The largest proportion of vessels in the brain are capillaries who represent a mesh with a total length of > 600 kilometers (7). This ensures an adequate supply of oxygen and nutrients to every brain cell. Beyond their high density, the cerebral capillaries are remarkable for their unique ability to tightly regulate the passage of blood-borne molecules to the brain. This so-called blood-brain barrier (BBB) protects the brain from harmful molecules and allows the entry of nutrients and immune modulating molecules and cells. Another specific feature of these cerebral small vessels is their highly dynamic propensity to regulate their diameter in order to adjust the blood flow to match the local energy demand. This phenomenon is described as neurovascular coupling (NVC), which relies on the activity of surrounding pericytes and astrocytes that translate neuronal activity into a vasodilatory message to increase the cerebral blood flow (CBF).

A decreased CBF is observed in both, stroke (penumbra area) and VaD (8–10). This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (e.g. catecholamines; angiotensin II) as well as from endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (11, 12)(20).

### **Molecular mechanisms associated with impaired blood flow**

#### 1) Exacerbation of Angiotensin II – AT<sub>1</sub>R signalling during stroke (Figure 1)

Angiotensin II (AngII) is a hormone that causes vasoconstriction and thereby increases the blood pressure. The contribution of AngII to the functional and structural remodelling of the cerebral vasculature is well known (13–16). AngII binds mainly to the Angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) to promote vasoconstriction (17, 18). AT<sub>1</sub>R is involved in vascular pathologies including ischemic stroke (19). During stroke, an increased production of Ang II is observed in the brain (20) leading to an increased AT<sub>1</sub>R-mediated vasoconstriction (21). This leads to a reduction in perfusion of brain tissue in the penumbra area, with subsequent expansion of the ischemic area and severity of the clinical consequences (19). This has led to the development of AT<sub>1</sub>R antagonists (or AngII Receptor blockers, ARBs, used since 30 years in clinical practice as anti-hypertensive drugs). ARBs have shown to be effective to increase CBF and protect from ischemic stroke in pre-clinical models (22–25). Numerous clinical trials have largely demonstrated the benefit of ARBs for stroke prevention (26, 27), but their contribution for the treatment of stroke remains debated (28, 29). While the Ang II – AT<sub>1</sub>R pathway is recognized as deleterious for CBF, its full blockade by AT<sub>1</sub>R antagonist may not be effective to maintain a physiological CBF.

#### 2) Impaired NO-sGC-cGMP signalling (Figure 1)

Nitric oxide (NO) is a key vasodilatory molecule that is produced by endothelial cells. NO stimulates the enzyme soluble guanylate cyclase (sGC) to produce the intracellular second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP)(30). The released cGMP can thereafter promote smooth muscle relaxation by activating the protein kinase G (PKG) that controls the myosin light chain phosphatase activity. The endothelial NO synthase (eNOS) and the sGC are found in vascular endothelial cells and their activity is decreased by hypertension following stroke, but also in brains of AD patients (31–33). Furthermore pathological processes in stroke and VaD, include increased oxidative stress and endothelial dysfunction, associated with decreased NO production, which in turn might lead to cognitive impairments (34–36). Recent research has shown that stimulating sGC with riociguat or vericiguat, both sGC stimulators which do not penetrate the BBB, are able to improve memory in rodents. This seems to be derived from an effect on the microvasculature, although this still has to be conclusively proven (PMID: 34440254; PMID: 35985509).

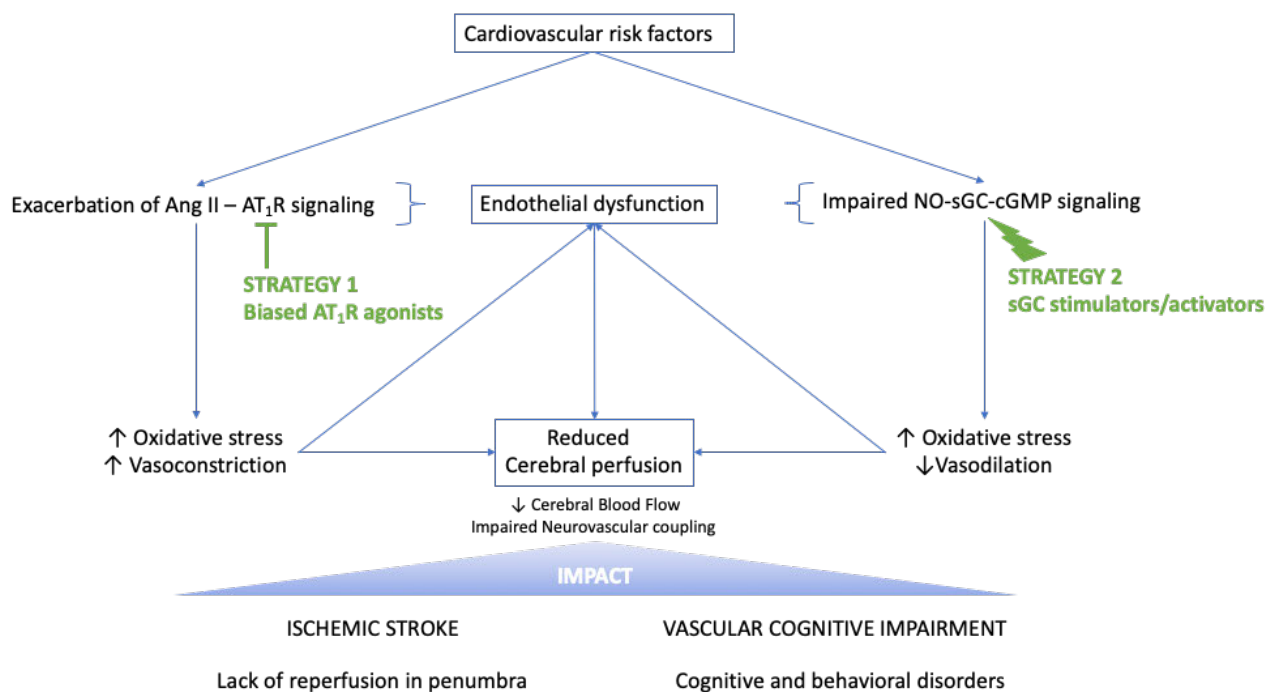
## Proposed pharmacological strategies to prevent or restore cerebral blood flow

### 1) AT<sub>1</sub>R biased agonists (Fig 1)

Biased agonism is the ability of a ligand to selectively activate a part of the signalling cascade associated to a given receptor. AT<sub>1</sub>R biased agonists are thus capable of activating  $\beta$ -arrestin-mediated signalling without activation of the classical Gq pathway that would promote vasoconstriction. In addition to their role to promote receptor internalization, including AT<sub>1</sub>R (37),  $\beta$ -arrestins can also activate signaling pathways leading to vascular remodelling that may possibly improve perfusion (38–40). This selective agonism offers thus new therapeutic perspectives. AT<sub>1</sub>R biased agonists are capable of activating the  $\beta$ -arrestin pathway of the AT<sub>1</sub>R without switching the Gq/11 pathway on (e.g. TRV120027)(41). It has been shown to decrease the blood pressure and improve cardiac contractility in healthy condition (41). This beneficial cardiovascular effect was also demonstrated in a canine model of heart failure, in which systemic vascular resistance was decreased thereby decreasing the heart's pumping activity (42). These studies support the benefits of biased AT<sub>1</sub>R for cardiovascular pathologies, yet their impact on cerebral perfusion remains to be investigated.

### 2) sGC stimulators/activators (Fig 1)

sGC can be targeted by sGC stimulators and activators. sGC stimulators act on the NO-sensitive sGC (on the Fe(II)sGC), whereas activators specifically target the NO non-sensitive sGC (on the Fe(III)sGC and apo-sGC)(43). sGC stimulators and activators have been developed for cardiovascular therapy (44). These drugs are able to increase the enzymatic activity of sGC to generate cGMP independently of NO. This drug class is being tested for pulmonary hypertension and heart failure but investigations at the cerebrovascular level to preserve cerebral blood flow are lacking.



**Figure 1:** Schematic representation of the implication of the Angiotensin-II-AT<sub>1</sub>R and NO-sGC-cGMP pathways for brain perfusion. Both pathways are impacted by cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes) which can impair the cerebral perfusion. The proposed pharmacological strategies to counteract these pathological mechanisms are shown in green. Exacerbation of Angiotensin II – AT<sub>1</sub>R signalling and impairment of NO-sGC-cGMP signalling contribute to the reduction of cerebral perfusion, promoting the development of cerebral lesions and dysfunction in the context of ischemic stroke and vascular cognitive

impairment and dementia. We aim to assess the relevance of biased AT<sub>1</sub>R agonists (Strategy 1) and sGC activators/agonists (Strategy 2) to preserve cerebral blood flow and neurovascular coupling.

### 3.2 Purpose

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

- If applicable, describe all subobjectives

#### Ultimate goal

The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke (post-acute phase) and vascular dementia.

We will specifically assess the ability of AT<sub>1</sub>R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and in post-acute phase of ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions.

#### Sub-objectives

Aim 1: To study the impact of AT<sub>1</sub>R biased agonists on CBF regulation:

- a) in healthy mice;
- b) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis) ;

Aim 2: To study the impact of sGC stimulators/activators on CBF regulation:

- a) in healthy mice;
- c) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis).

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The feasibility of the project is warranted by the scientific and technical skills present with the researchers of our team:

- pharmacology of the renin-angiotensin-system including AT<sub>1</sub>R (15, 16, 45-48)
- pharmacology of sGC-cGMP signalling (49-51)
- animal models of vascular cognitive impairment (52-54)
- CBF imaging in hypoperfused mice (Bilateral Carotid Artery Stenosis model) for the study of neurovascular coupling (PV2017-001)

The project's feasibility is further strengthened by the existence of previous pre-clinical and clinical studies who have successfully used the proposed pharmacological approaches for cardiovascular indications other than stroke, such as heart failure (41, 42, 55, 56) – this demonstrates the safety of the proposed pharmacological interventions. Identifying beneficial effects in pre-clinical models may pave the way for drug clinical trials for both stroke and vascular dementia indications.

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

No

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



### 3.3 Relevance

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

This project is of relevance for cerebrovascular diseases and especially for conditions like ischemic stroke and vascular- dementia.

#### Stroke

Estimates from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD 2010) ranked stroke as the second most common cause of death(1) and the third most common cause of disability worldwide in 2010(2). In 2019, stroke was still the second cause of death worldwide according to the World Health Organization (WHO Health report 2019). The treatment of acute ischemic stroke has undergone dramatic changes recently subsequent to the demonstrated efficacy of endovascular thrombectomy(57). The selection of patients for this therapy is however based on timely CT or MR imaging and should be initiated within 6 hours of stroke onset. Alternatively intravenous thrombolysis with tissue-type plasminogen activator remains the standard acute stroke therapy within the initial 3-4.5 hours after stroke onset(58). Overall, the therapeutic time window and eligibility criteria for both approaches remain limited and new therapeutic options are urgently needed to restore CBF in the ischemic and at-risk areas. To circumvent this temporal challenge, clinicians are in urgent need of treatments for sub-acute (>6h) and post-acute/chronic management of stroke patients.

#### Dementia

Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide, while nearly 10 million new cases are reported each year, with WHO estimations of 82 million cases in 2030 due to ageing(4). Out of all dementia cases, approximately 20% show VaD pathology(3). VaD causes the impairment of at least one cognitive domain that severely disrupts daily living. The treatment regime involves lifestyle interventions, control of vascular risk factors, and cognition enhancers that were originally developed for Alzheimer's disease (AD)(59). Yet there is only limited evidence that any of these treatments prevent disease progression.

#### References

1. R. Lozano *et al.*, *Lancet*. **380**, 2095–2128 (2012).
2. *Alzheimer's & Dementia*. **16**, 391–460 (2020).
3. WHO | Dementia: a public health priority. *WHO*, (available at [http://www.who.int/mental\\_health/publications/dementia\\_report\\_2012/en/](http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/)).
4. Geneva: World Health Organization, *Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025* (WHO, 2017).
5. M. Dichgans, D. Leys, *Circ. Res.* **120**, 573–591 (2017).
6. M. E. Raichle, D. A. Gusnard, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**, 10237–10239 (2002).
7. D. J. Begley, M. W. Brightman, *Prog Drug Res.* **61**, 39–78 (2003).
8. S. M. Wong *et al.*, *Neurology*. **92**, e1669–e1677 (2019).
9. J. F. A. Jansen *et al.*, *Sci Rep*. **6**, 10 (2016).
10. L. Østergaard *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab.* **33**, 635–648 (2013).
11. M. G. Myers, J. W. Norris, V. C. Hachniski, M. J. Sole, *Stroke*. **12**, 200–204 (1981).
12. J. Schulze, A. Vogelgesang, A. Dressel, *Aging Dis.* **5**, 327–339 (2014).
13. F. Dupuis, J. Atkinson, P. Limiñana, J.-M. Chillon, *Br. J. Pharmacol.* **144**, 349–356 (2005).
14. F. Dupuis, J. Atkinson, P. Limiñana, J.-M. Chillon, *J. Hypertens.* **23**, 1061–1066 (2005).
15. S. Foulquier *et al.*, *PLoS ONE*. **7**, e42469 (2012).
16. S. Foulquier, I. Lartaud, F. Dupuis, *PLoS ONE*. **9**, e110766 (2014).
17. J.-M. Vincent *et al.*, *Stroke*. **36**, 2691–2695 (2005).
18. S. Foulquier, U. M. Steckelings, T. Unger, *Nature*. **493**, S9 (2013).
19. T. Walther *et al.*, *FASEB J.* **16**, 169–176 (2002).
20. J. Li *et al.*, *BMC Complement Altern Med.* **14**, 441 (2014).
21. E. Stenman, L. Edvinsson, *Stroke*. **35**, 970–974 (2004).
22. J. Zhou *et al.*, *Stroke*. **37**, 1271–1276 (2006).
23. Y. Nishimura, T. Ito, J. M. Saavedra, *Stroke*. **31**, 2478–2486 (2000).
24. W. Groth, A. Blume, P. Gohlke, T. Unger, J. Culman, *J. Hypertens.* **21**, 2175–2182 (2003).
25. T. Ito *et al.*, *Stroke*. **33**, 2297–2303 (2002).
26. B. Dahlöf *et al.*, *Lancet*. **359**, 995–1003 (2002).
27. H. Lithell *et al.*, *J Hypertens.* **21**, 875–886 (2003).
28. J. Schrader *et al.*, *Stroke*. **34**, 1699–1703 (2003).
29. E. C. Sandset *et al.*, *Lancet*. **377**, 741–750 (2011).
30. F. Z. Mónica, K. Bian, F. Murad, *Adv Pharmacol.* **77**, 1–27 (2016).
31. T. M. Paravicini, R. M. Touyz, *Cardiovasc Res.* **71**, 247–258 (2006).
32. F. Langhauser *et al.*, *NPJ Syst Biol Appl.* **4**, 8 (2018).
33. W. L. Bonkale, B. Winblad, R. Ravid, R. F. Cowburn, *Neurosci Lett.* **187**, 5–8 (1995).
34. T. M. De Silva, F. M. Faraci, *Cell Mol Neurobiol.* **36**, 241–258 (2016).
35. S. Chrissobolis, A. A. Miller, G. R. Drummond, B. K. Kemp-Harper, C. G. Sobey, *Front. Biosci.* **16**, 1733–1745 (2011).

36. E. Cuadrado-Godia *et al.*, *J Stroke*. **20**, 302–320 (2018).
37. L. Hunyady, K. J. Catt, A. J. Clark, Z. Gáborik, *Regul Pept*. **91**, 29–44 (2000).
38. R. T. Kendall *et al.*, *J Biol Chem*. **289**, 26155–26166 (2014).
39. L. M. Luttrell *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 2449–2454 (2001).
40. Y. Taniyama *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol*. **287**, C494–499 (2004).
41. G. Boerrigter *et al.*, *Circ Heart Fail*. **4**, 770–778 (2011).
42. G. Boerrigter, D. G. Soergel, J. D. Violin, M. W. Lark, J. C. Burnett, *Circ Heart Fail*. **5**, 627–634 (2012).
43. P. Sandner *et al.*, *Handb Exp Pharmacol*. **264**, 355–394 (2021).
44. S. Breitenstein, L. Roessig, P. Sandner, K. S. Lewis, *Handb Exp Pharmacol*. **243**, 225–247 (2017).
45. C. Delaitre, M. Boisbrun, S. Lecat, F. Dupuis, *Int J Mol Sci*. **22**, 6738 (2021).
46. M.-L. Bouessam *et al.*, *Br J Pharmacol*. **176**, 2049–2062 (2019).
47. M. Meyer *et al.*, *Eur J Med Chem*. **158**, 334–352 (2018).
48. S. Foulquier *et al.*, *J Hypertens*. **29**, 1392–1399 (2011).
49. L. G. J. M. Borghans, A. Sambeth, J. Prickaerts, J. G. Ramaekers, A. Blokland, *Psychopharmacology (Berl)*. **235**, 2407–2416 (2018).
50. E. Nelissen *et al.*, *Biomedicines*. **9**, 1047 (2021).
51. J. Prickaerts, J. de Vente, W. Honig, H. W. M. Steinbusch, A. Blokland, *Eur. J. Pharmacol*. **436**, 83–87 (2002).
52. S. Foulquier *et al.*, *Hypertens. Res*. **41**, 817–827 (2018).
53. D. Kerkhofs *et al.*, *Theranostics*. **10**, 9512–9527 (2020).
54. T. Koizumi *et al.*, *J Neuroinflammation*. **16**, 79 (2019).
55. G. M. Felker *et al.*, *JACC Heart Fail*. **3**, 193–201 (2015).
56. P. W. Armstrong *et al.*, *N Engl J Med*. **382**, 1883–1893 (2020).
57. O. A. Berkhemer *et al.*, *N. Engl. J. Med*. **372**, 11–20 (2015).
58. L. Catanese, J. Tarsia, M. Fisher, *Circ Res*. **120**, 541–558 (2017).
59. O. A. Skrobot *et al.*, *Alzheimers Dement*. **14**, 280–292 (2018).

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

#### Academic sector

We aim to unravel mechanisms of relevance to protect from cerebrovascular diseases by targeting two different signalling pathways. This project will bring new insights on the studied pharmacological targets.

#### Pharmaceutical industry

Our pre-clinical investigations will be useful for R&D sectors of pharmaceutical companies. By validating the relevance of the studied targets, it may attract companies to screen their small molecule libraries to identify and screen new drug candidates with increased selectivity and efficacy.

#### Society /Patients

This study is intended to test drugs that may prevent cognitive impairment after stroke or VaD.

Taking into consideration the major burden caused by stroke and dementia on our societies (see 3.1 Background section), we consider this largely outweighs the moderate to severe discomfort experienced by the animals, their violation of integrity and the termination of their life, as detailed in our proposal. Stroke is the second most common cause of death and the third most common cause of disability worldwide and a major risk factor for cognitive impairment and dementia. In addition, ~10 million people suffer from dementia worldwide: beyond the patients themselves, this also negatively impacts their families, our healthcare systems and the worldwide economy. Furthermore, this impact is expected to increase with the ageing of the population. Our study will bring new insights into the function and relevance of signalling pathways for the regulation of cerebral blood flow in stroke and dementia. This fundamental research is a first step towards the testing of corresponding drugs in stroke and/or vascular dementia patients.

#### Animals

To limit the impact on animals, the most relevant models with the least discomfort have been selected for the study of ischemic stroke and vascular dementia. Furthermore, all procedures will be approved by the animal welfare committee to guarantee a minimal discomfort and ensure the group size is adequate to assess relevant differences on the main readout parameters.

### 3.4 Strategy

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

We will study the effect of acute and chronic impact of the proposed treatment.

Acute treatment: It is important to assess the acute effect of the drug on cerebral blood flow to know if we can expect a beneficial effect in the acute treatment phase of stroke, due to immediate vaso-active effects.

Chronic treatment: It is important to assess the chronic effect of the drug on cerebral blood flow to study possible beneficial effect in a chronic condition like VaD possibly mediated by cellular effects such as angiogenesis, in addition to the vaso-protection.

The time windows for acute and chronic treatments are specified in 3.4.2 under the description of the animal models.

#### Acute treatments (Figure 2)

A maximum of 3 compounds will be administered acutely (i.v.) in healthy and diseased mouse models per drug class (i.e., biased AT<sub>1</sub>R agonist and sGC stimulator/activator). The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.

- In healthy mice, the aim is to assess their acute impact on resting physiological CBF;
- In diseased mice (1 ischemic stroke model = distal middle cerebral artery occlusion and 1 cerebral hypoperfusion model to mimic VaD = bilateral carotid artery stenosis), the aim is to assess their ability to restore impaired CBF.

The presence of an effect in healthy mice is not a pre-requisite for the study of the corresponding compound in diseased models. Indeed, a compound might not increase the cerebral blood flow in mice with a physiological values while it might however still prove to be beneficial in diseased models where the flow is reduced.

In addition, the compounds may be studied in both diseased models: the presence of an effect in one diseased model is not a pre-requisite for its study in the second diseased model. Since the pathophysiological mechanisms differ in both diseased models, one compound may be effective in restoring CBF in one condition only.

N.B.: the study of AT<sub>1</sub>R biased agonists will require the administration of the natural ligand Angiotensin II to observe the counteracting AT<sub>1</sub>R effects of the tested compound. This will be done in healthy and diseased animals as the expression of AT<sub>1</sub>R will differ with the condition. The procedure will be detailed in the corresponding working protocol. In short, Ang II will be administered before and after the acute administration of the biased agonist. We expect to observe an acute decrease in CBF after AngII injection subsequent to the AT<sub>1</sub>R-mediated vasoconstriction (e.g. mimicking the AngII release during stroke) and we expect to observe an attenuation of this CBF decrease upon treatment with an AT<sub>1</sub>R biased agonist due to the beta-arrestin mediated internalization of the AT<sub>1</sub>R.

#### Chronic treatments (Figure 2)

A maximum of 3 compounds per drug class will be tested in chronic conditions in healthy and diseased mouse models. The duration of the administration will be adapted to each animal model to match the time course of the CBF reduction: 1 week maximum for the ischemic stroke model and 3 weeks maximum for the cerebral hypoperfusion model.

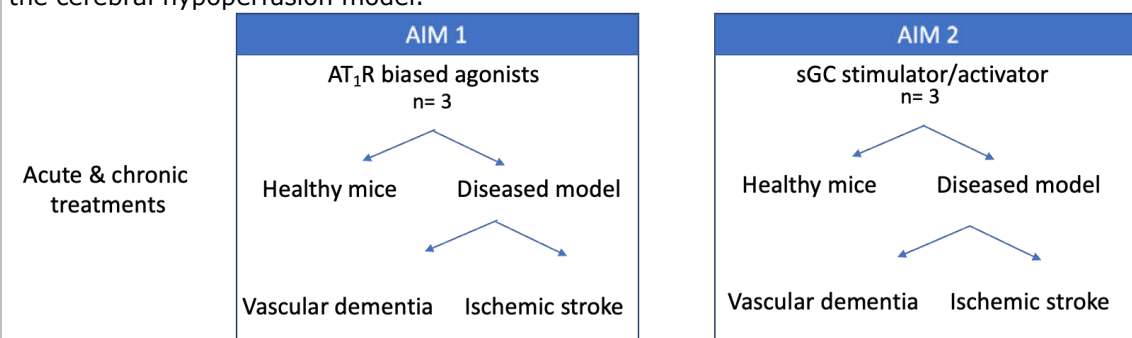


Figure 2: Schematic overview of the study design for both Aim1 and Aim2.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The strategy has been chosen to characterize the acute and chronic effects of the compounds on the CBF in health and disease. To assess the differential impact of the studied signalling pathways on physiological and pathological CBF, the tested drugs will be studied in healthy and diseased animal models that exhibit an impaired CBF. This will be achieved in the Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) model to induce ischemic stroke and in the Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS) model to mimic VaD (see Appendix 1). These 2 models have been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:

**Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO):** this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.

**Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS):** this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

**dMCAO model:**

acute timepoint: max 3 days after the induction of stroke;

chronic timepoint: max 7 days after stroke.

**BCAS model:**

acute timepoint: max 7 days after the induction of cerebral hypoperfusion;

chronic timepoint: max 3 weeks after the induction of cerebral hypoperfusion.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion
2	
3	
4	



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1 Provide the  
· approval number  
1 of the  
'Netherlands Food  
and Consumer

5.1 lid2h

1 Provide the name  
· of the licenced

5.1 lid2h

1 List the serial  
· number and type  
3 of animal  
procedure

*Use the numbers  
provided at 3.4.3  
of the project  
proposal.*

Serial	Type of animal
1	Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

### Ultimate goal

To assess the ability of AT<sub>1</sub>R biased agonists (Aim 1) and sGC stimulators/activators (Aim 2) to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions (Figure 1). The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.

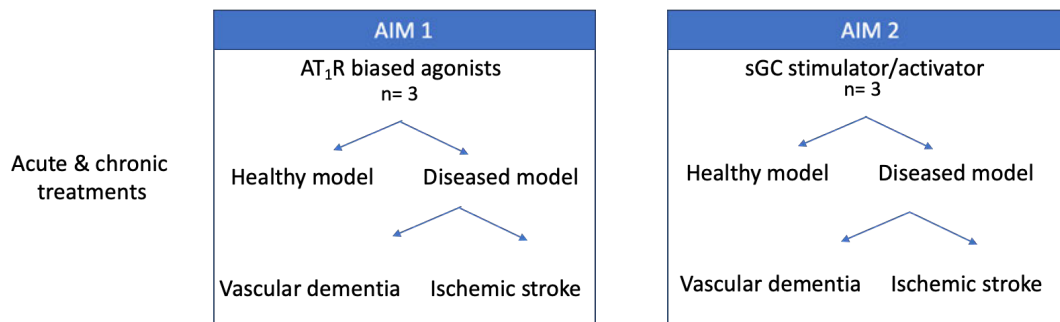


Figure 1: Overview of the experimental design

### Disease models:

**Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion:** this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostratial arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. (Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.)

**Bilateral Carotid Artery Stenosis:** this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

**Primary outcome parameter for both Aims 1 and 2:** relative cerebral blood flow changes (CBF in %) vs baseline or control and cerebral blood flow change mediated by neurovascular coupling (in %).

The CBF will be measured by Laser Speckle Contrast Imaging. In brief, this imager measures the blurring effect of a speckle pattern created by the interference of the moving red blood cells within the blood vessels with the coherent light emitted by the device (near-infrared laser light).

**Justification:** A decreased CBF is observed in both, stroke and VaD. This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (focus of Aim 1) as well as from an endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (focus of Aim 2). We want therefore to assess the efficacy of modulating the signalling pathways to improve CBF and CBF reactivity in healthy and disease condition.

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

Overview of the proposed animal procedures:

N.B.: not all procedures will be performed in all animals. The different animal studies and the associated estimated cumulative discomforts are listed in the Table section B.

Procedures	Nature	Duration & Frequency
Body weight measurement	Non-invasive, awake animals	Max. 1x/day (max 1 min)
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)	Invasive, anaesthetized animals	1x (max 2h)
Garcia neurological test	Non-invasive, awake animals	Max. 1x/day (max 2 min)
Distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO)	Invasive, anaesthetized animals	1x (max 2h)
Vessel cannulation	Invasive, anaesthetized animals	Max 1x (max 1h)
CBF measurement and neurovascular coupling	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 2x (max 2h)
Treatment in drinking water or gavage*	Non-invasive, awake animals	Max 1x/day (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)
Treatment via SC injection*	Minimally invasive, awake animals	Max 1x/day (acute study: max 7 days; not for chronic study)
Treatment via osmotic minipump	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 1x implantation (duration max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)
Blood collection** Via vena saphena Max 100 µl/week	Minimally invasive, awake, restrained animals	1x/week (duration max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study) (max 2 min per collection)
I.V. injection of tracers	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 1x (1 min)
Terminal anesthesia and perfusion	Invasive, anaesthetized animals	Max 1x (max 30 min)

\*: The administered volumes and frequency of the administration procedures (oral gavage and injections) will follow NC3R guidelines (<https://researchanimaltraining.com/article-categories/procedures-with-care/>)

\*\* : Maximum blood volume and frequency of blood collection will follow NC3R guidelines (<https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse> )

Description and justification of the proposed animal procedures:

Body weight measurement: Regular body weight measurement to monitor the animal welfare;

Animal welfare scoring or neurological scoring to assess animal discomfort and humane endpoints

Blood collection: venous blood collection (vena saphena) to assess systemic parameters involved the disease progression (e.g. inflammatory cytokines) and the impact of drug treatments (mild discomfort). Maximum blood volume and intervals for blood collection will follow NC3R guidelines (<https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse>) :

- 1x/week; maximum once for acute study; maximum 3 times for chronic study;
- Maximum volume per week per collection: 100 µL via the vena saphena

Vessel cannulation under anesthesia (terminal procedure):

- cannulation of the femoral artery to allow acute blood pressure measurement during the CBF imaging which is of importance to assess the acute drug effects on the blood pressure regulation and its possible impact on CBF regulation;

A possible impact of the tested compounds on blood pressure is of major importance for:

- Knowing if the compounds might impact the blood pressure and thus be a positive or negative side effect of the therapeutic strategy;
  - Knowing if the CBF measurement is performed within the normal (physiological) blood pressure range;
  - Knowing if the change in CBF observed upon the administration of the tested compound is independent of any blood pressure changes. Indeed, the cerebral circulation benefits from the autoregulation principle. It adapts to maintain CBF constant over a certain range of blood pressure values i.e. CBF should not be altered when blood pressure is decreased or increased until certain physiological limits. However, upon drastic increases and decreases of the blood pressure (e.g. hypertensive crisis; hemorrhage), the CBF will follow the blood pressure passively.
- cannulation of the carotid artery to allow injection of compounds and the study their acute effects on the CBF
  - cannulation of the jugular vein to allow perfusion of anaesthetics.

CBF measurement and neurovascular coupling: the cortical CBF will be assessed in anaesthetized animals using a laser doppler or speckle contrast imaging technique. This will require a minimally-invasive surgical procedure to image the CBF transcranially. In short, the skin over the skull is retracted with a colibri retractor to allow the visualization of the skull. The Laser Speckle Contrast Imager is then positioned above the skull to image CBF through the skull. CBF measurement will be performed under conditions to test the cerebrovascular reactivity such as neurovascular coupling (e.g. whisker stimulation; injection of drugs). Neurovascular coupling corresponds to the transient change in CBF due to neuronal activity. The study of neurovascular coupling allows to test the normal reactivity of cerebral vessels without the need to inject vasoreactive compounds. In animal studies with mice and rats, neurovascular coupling is studied via the mechanical stimulation (movement) of whiskers upon a certain frequency (5-10Hz) for a short period (usually 20-30 seconds) in lightly sedated animals. The detailed procedure will be submitted at the stage of the working protocol. This is a procedure we have already performed in several mouse and rat studies successfully. (mild discomfort).

CBF is measured during a first imaging session: before and after the surgical interventions to assess the CBF impairment induced in the model at the start of the animal study. In addition CBF is also imaged at the end of the animal study (second imaging session; terminal procedure) to assess the impact of the treatment on CBF and neurovascular coupling. The number of imaging sessions is limited to 2 for the disease models as indicated in the table with the procedures (section A). For the "acute study: with healthy mice groups however, only one terminal imaging session is needed.

Drug treatments: the most suitable route will be preferred.



In healthy animals, consecutive increasing doses will be administered i.v. to investigate the direct effects of the tested compounds on CBF in physiological conditions (dose-response curve);  
In diseased animal models, a single treatment dose will be selected per compound for the disease animal models based on previous studies (published and unpublished work).

i.v. injection of tracers: injection of vascular tracers to assess the blood brain barrier permeability by immunohistochemistry

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS): this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. Upon exposure of the carotid arteries, microcoils (0,18 mm internal diameters) will be placed around both common carotid arteries to reduce their diameters (30 min delay between both carotids). The CBF is measured before and after placing the microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm. The animals will be studied for a maximum period of 3 weeks as this is the maximal period with constant CBF reduction and period when structural brain lesions and cognitive decline develop. We will therefore study the impact of acute treatment (1 week, with established CBF reduction but no major lesion) and chronic treatment (3 weeks, CBF reduction with structural lesions).  
(Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO): mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation. In short, a skin incision is made between the ear and eye and the temporal muscle is detached from the skull (muscle flap) to allow the visualization of the MCA branches through the skull. The MCA and its branches are coagulated using electrocoagulation forceps. The resulting infarct is cortical and the relative infarct volume corresponds to the majority of human strokes. The animals will be studied for a maximum period of 1 week as the functional impact in the model is maximal in the first week and possible vascular collateralization can occur after 1 week. This also corresponds to the desired treatment window in stroke patients (first days after stroke). We will therefore study the impact of acute treatment (max 3 days, period in which the ischemic area is expanding and reach its maximum volume) and chronic treatment (1 week, maximum ischemic area). (Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.)

Terminal anesthesia and perfusion: perfusion protocols will be chosen based on the planned investigations ex vivo (molecular vs IHC) (mild discomfort).

---

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

---

Power calculations will be made using G\*Power considering the use of One-way ANOVA to assess the impact of studied drug on the CBF in healthy mice (dose effect) or its impact in diseased mice (3 groups: Disease treated Disease non-treated, vs non-disease). Group size calculations will be based on previous own studies to take into account the variability of the main readout parameters. The calculations will be detailed in each working protocol. At this stage, the group size is estimated as indicated below:

group size calculation using G\*Power v3.1.9.6.

F-test (One-way ANOVA fixed effects, a priori group size calculation),

3 groups (e.g. Sham, dMCAO untreated, dMCAO treated),

$\alpha = 0,05$ ;  $\beta = 0,20$ , power = 0,80

Latest CBF reactivity value from control group (WP 2018-016-009 - AVD5.1 lid2h )

$m=15,59\%$   $SD=3,2\%$ ,  $cv=20,5\%$

Desired effect size = 13%, thus effect size  $f = 0,796$ ;

Total sample size (for 3 groups) = 30, So  $n=10$ /group.

Based on a previous study (WP2017-001-005; AVD5.1 lid2h ), the dropout rate is estimated 10% in Sham (and healthy control) groups (5% dropout for unexpected reason + 5% for surgical complications or reaching humane endpoints), while it is 20% for the diseased models (BCAS, dMCAO) (5% dropout for unexpected reason + 15% for surgical complications or reaching humane endpoints)

Therefore the final group size calculation is:

Sham, Control  $\rightarrow n(\text{final}) = 10 * 1,10 = 11$  mice/group

BCAS, dMCAO  $\rightarrow n(\text{final}) = 10 * 1,20 = 12$  mice/group

The group size calculation will be performed for every new animal study (for every working protocol) to take into account the latest statistical data (e.g. dropout rate).

## B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
-	Mus musculus	Licensed vendors	Adult	1038	Male	No	C57 BL6 /J

Provide justifications for these choices

Species	Mus musculus
Origin	Licensed vendors
Life stages	Adult: For Healthy groups: 8-10 weeks-old For BCAS/Sham: 8-10 weeks-old For dMCAO/Sham: 10 weeks-old

Number

table	Group number	Acute	Chronic	Healthy	Disease - BCAS	Disease - MCAO	Total
1	1.1			3 compounds x 11 mice			33
	1.2 1.3 1.4				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated + 11 Sham)		105
	1.5 1.6 1.7					3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
	1.8 1.9			3 compounds x 11 mice x 2 groups (treated/non-treated)			66
	1.1 0 1.1 1 1.1 2				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated + 11 Sham)		105
	1.1 3 1.1 4 1.1 5					3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
	<b>Maximum total Aim 1</b>						
2	2.1			3 compounds x 11 mice			33
	2.2 2.3 2.4				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated + 11 Sham)		105

2.5 2.6 2.7				3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
2.8 2.9			3 compounds x 11 mice x 2 groups (treated/non- treated)		66
2.1 0 2.1 1 2.1 2				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated +11 Sham)	105
2.1 3 2.1 4 2.1 5				3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
<b>Maximum total Aim 2</b>					<b>519</b>
<b>Maximum total study</b>					<b>1038</b>

Sham animals will be required for all diseased groups to assess if the treatment is able to restore CBF to normal values.

We will study the effect of acute and chronic impact of the proposed treatment. Acute treatment: It is important to assess the acute effect of the drug on cerebral blood flow to know if we can expect a beneficial effect in the acute treatment phase of stroke, due to immediate vaso-active effects.

Chronic treatment: It is important to assess the chronic effect of the drug on cerebral blood flow to study possible beneficial effect in a chronic condition like VaD possibly mediated by cellular effects such as angiogenesis, in addition to the vaso-protection.

The investigations in healthy mice are also split into acute and chronic studies. In the acute study, we aim to study the direct effect of compounds on CBF i.e. the tested drug will be injected i.v. during the imaging session, allowing us to do a dose-response curve experiment (see liist of procedures). In the chronic study on the other hand, we aim to assess the long-term effect of the treatment on CBF in physiological conditions and assess the CBF before/after this period, therefore requiring a control, untreated group.

The presence of an effect in healthy mice is not a pre-requisite for the study of the corresponding compound in diseased models. Indeed, a compound might not increase the cerebral blood flow in mice with a physiological values while it might however still prove to be beneficial in diseased models where the flow is reduced.

In addition, the compounds may be studied in both diseased models: the presence of an effect in one diseased model is not a pre-requisite for its study in the second diseased model. Since

	the pathophysiological mechanisms differ in both diseased models, one compound may be effective in restoring CBF in one condition only.
Gender	<p>Males will be used instead of females since the female sex steroid hormone estradiol exerts neuroprotective effects on the development of ischemic lesion, which could influence the outcome of our experiment. After menopause, the risk for stroke and dementia increase in women due to the decrease in the neuroprotective effects of estrogens. This would require to perform ovariectomy in the female mice for healthy and diseased models, significantly increasing the number of animals, considering also the additional drop-out due to the surgery. This would make the procedures unrealistic considering the number of groups to be studied. It has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study.</p> <p>Koellhoffer EC, McCullough LD. The effects of estrogen in ischemic stroke. <i>Transl Stroke Res.</i> 2013 Aug;4(4):390-401. doi: 10.1007/s12975-012-0230-5.</p> <p>Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. <i>J Cereb Blood Flow Metab.</i> 2000 Apr;20(4):631-52. doi: 10.1097/00004647-200004000-00001.</p>
Genetic alterations	No
Strain	C57BL6/J

### C. Accommodation and care

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

Yes

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

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

The surgical procedures will be performed under general anaesthesia. The depth of anaesthesia will be monitored regularly by checking the presence of reflexes. Prior, during and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent and relieve the pain associated with the surgery.

Welfare score sheets will be filled in for each animal and will be used throughout the entire duration of the study to ensure that the discomfort of the animals – due to the surgical procedures and the disease - do not exceed the humane endpoints defined for the study.

In summary, the probability of suffering will be minimized by a combination of anesthesia, pain control, optimal housing as well as regular inspection of animal welfare.

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

1) As a result of the BCAS and dMCAO surgeries, animals will exhibit an impaired behavior (expected);

After BCAS surgery, possible neurological complications may appear such as an impaired locomotor function and behavior (hypo- or hyper-activity); an abnormal posture; a poor coat condition.

After dMCAO surgery, the animals will show ischemic stroke related symptoms, varying from healthy, mild unilateral paralysis, non-severe unilateral paralysis with curving of the back to severe unilateral or bilateral paralysis with pronounced curving of the back

2) A risk for possible complications after surgery;

3) Although no major complications were observed in previous studies, there is always a risk for possible complications due to drug treatment due to an unknown/non-reported toxicity.

Explain why these effects may emerge.

1) This effect is expected for the model studied

In BCAS: these effects are expected due to the reduced cerebral perfusion;

In dMCAO: these effects are expected due to the induction of an ischemic stroke;

2) This effect might occur following the surgical interventions;

3) it is not possible to predict the absence of toxicity in the model studied.

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

1) To minimize discomfort post-surgery, dietgels and wet food will be made accessible to promote food and water intake. Additionally pain killer drugs will be administered in the days following the surgery. If the severity of pathology leads to the humane endpoint described below, the animal will be euthanized to avoid unnecessary pain or distress;

2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, loose suture, poor wound healing, edema formation,...) and a solution will be implemented to avoid future complications.

3) If the toxicity observed leads to a discomfort exceeding the moderate discomfort expected for the study and/or if it impairs the interpretation of the data, the treatment will be interrupted and animals will be euthanized if humane endpoints are reached.

## **E. Humane endpoints**

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

No > Continue with question F

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

General considerations – humane endpoints for healthy mice groups:

Humane endpoints will be considered if animals exhibit signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented by trained and experienced team members during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress reach humane endpoints, euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). A cumulative welfare score >6 or one criteria scored 3 will be considered a humane endpoint. Each criteria (awareness, posture, movement, social behavior, facial expression, coat condition, nest building, breathing pattern) is scored from 0 to 3 (0=normal; 3= severely altered). Furthermore, a strong reduction in body weight will also be considered a humane endpoint according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/ or rehydration, or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.

Procedure/group-dependent considerations for the BCAS/Sham and dMCAO/Sham groups:

After surgery, the Garcia neurological test will be used 2x/week to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>.

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>;
- a Garcia score  $\leq 10$  (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will be considered a humane endpoint for the BCAS/Sham groups
- a Garcia score  $\leq 7$  will be considered a humane endpoint for the dMCAO/Sham groups

Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .

---

Indicate the likely incidence.

The expected incidence is low for Sham groups (5%) and moderate for BCAS and dMCAO groups (15%).

---

## **F. Classification of severity of procedures**

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

---

In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.

An overview of the estimated discomfort per procedure and animal series and groups is given below. For clarity, the descriptions of the procedures and their corresponding discomfort have been split into 3 tables for every model (Table 1, healthy mice; Table 2, Sham and dMACO mice; Table 3, Sham and BCAS mice).

**Table 1: Procedures and corresponding discomfort for the healthy mice groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B: 1.1, 1.8, 1.9, 2.1, 2.8, 2.9

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = non-recovery procedure (1 day);

Chronic timepoint = 3 weeks

Procedures	Estimated discomfort	AIM 1 Acute	AIM1 Chronic	AIM 2 Acute	AIM 2 Chronic	Total
Body weight measurement	mild	33	66	33	66	198
Animal welfare scoring	mild	33	66	33	66	198
Blood collection	moderate	33	66	33	66	198
Vessel cannulation	moderate	33	66	33	66	198
CBF measurement and neurovascular coupling	moderate	33	66	33	66	198
Treatment in drinking water or gavage	Mild/moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	33	66	33	66	198
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 7 days; not for chronic study)	33	0	33	0	66
Treatment via osmotic minipump	Moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	33	66	33	66	198
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	33	66	33	66	198
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	33	66	33	66	198
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (66)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (66)</b>	<b>Moderate (198)</b>



**Table 2: Procedures and corresponding discomfort for the Sham/dMCAO mouse groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B:

1.5, 1.6, 1.7, 1.13, 1.14, 1.15, 2.5, 2.6, 2.7, 2.13, 2.14, 2.15

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = 3 days; Chronic timepoint = 7 days

Procedures	Estimated discomfort	AIM 1 Acute	AIM1 Chronic	AIM 2 Acute	AIM 2 Chronic	Total
Body weight measurement	mild	105	105	105	105	420
Neurological scoring	mild	105	105	105	105	420
Blood collection	moderate	105	105	105	105	420
Sham surgery for dMCAO	moderate	33	33	33	33	132
dMCAO surgery	severe	72	72	72	72	288
Vessel cannulation	moderate	105	105	105	105	420
CBF measurement and neurovascular coupling	moderate	105	105	105	105	420
Treatment in drinking water or gavage	Mild/moderate (max 3 days for acute study; max 7 days for chronic study)	105	105	105	105	420
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 3 days; max 7 days for chronic study)	105	105	105	105	420
Treatment via osmotic minipump	Moderate (not for acute study; max 7 days for chronic study)	0	105	0	105	210
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	105	105	105	105	420
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	105	105	105	105	420
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (132)</b>

		<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (288)</b>

**Table 3: Procedures and corresponding discomfort for the Sham/BCAS mouse groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B:

1.2, 1.3, 1.4, 1.10, 1.11, 1.12, 2.2, 2.3, 2.4, 2.10, 2.11, 2.12,

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = 7 days; Chronic timepoint = 3 weeks

<b>Procedures</b>	<b>Estimated discomfort</b>	<b>AIM 1 Acute</b>	<b>AIM1 Chronic</b>	<b>AIM 2 Acute</b>	<b>AIM 2 Chronic</b>	<b>Total</b>
Body weight measurement	mild	105	105	105	105	420
Neurological scoring	mild	105	105	105	105	420
Blood collection	moderate	105	105	105	105	420
Sham surgery for BCAS	moderate	33	33	33	33	132
BCAS surgery	moderate	72	72	72	72	288
Vessel cannulation	moderate	105	105	105	105	420
CBF measurement and neurovascular coupling	moderate	105	105	105	105	420
Treatment in drinking water or gavage	Mild/moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	105	105	105	105	420
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day - acute: max 7 days; not for chronic study)	105	0	105	0	210
Treatment via osmotic minipump	Moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	0	105	0	105	210
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	105	105	105	105	420
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	105	105	105	105	420
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (420)</b>

**In summary, a maximum of  $198+132+420 = 750$  mice will experience moderate discomfort (72% of all mice) and a maximum of 288 mice will experience severe discomfort (28% of all mice).**

For further details on the maximal discomfort for each experiment, please see the tables in section B "The Animals" of this appendix. For details on the expected levels of discomfort for the individual procedures, please see the descriptions in section A "Experimental approach and primary outcome parameters"

---

## G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	<p>There is currently no alternative approach allowing the study of cerebral blood flow. There is also no alternative suitable to replace models of stroke and cerebral hypoperfusion.</p> <p>Replacement with human post-mortem material: human post-mortem samples are by definition late-stage pathological tissues that do not allow any functional and longitudinal studies</p> <p>Replacement with human participants: it is important (and mandatory) to perform pre-clinical investigations to assess the validity of the therapeutic approach. Clinical trials are also not suitable for mechanistic understanding of the pathology and treatment. For example, a phase 0 clinical study is aimed at verifying the safety and assessing some pharmacokinetic parameters of a drug but not to solve fundamental research questions. One low, subtherapeutic, dose can be tested in a phase 0 thus limiting the investigations for the study of the regulation of the CBF.</p> <p>Replacement with cells: beyond 2D cell work, 3D cell culture models that includes flow are not capable of reproducing the complexity of the cerebral cellular environment. Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies with capillaries (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents). We are already investigating the effect of some compounds on middle cerebral arteries mounted in arteriographs. This is useful to test several compounds at multiple doses, investigate some mechanisms but it concerns large vessels (&gt;100 µm) and it is not very informative for the study of microcirculation (~ 6-10 µm) as the expression of receptors, enzymes, ... differ a lot between vascular beds. Therefore our ex vivo investigations – although useful – can not replace the use of animals for the present project. There is also no model that allows the study of neurovascular coupling (i.e. the translation of neuronal activity into a vasodilatory reaction).</p>
Reduction	<p>The number of animals needed for this study has been calculated based on previous studies to ensure a proper statistical power is reached to assess differences in the primary readout parameters. Group size calculation will be performed prior to every working protocol as described in section A of the present appendix.</p>
Refinement	<p>In addition to measures taken to minimize pain and discomfort, environmental enrichment and social housing will be done to improve animal's welfare. Furthermore the animal models have been chosen after careful consideration of alternative models and it has been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:</p> <p>Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. <i>J. Vis. Exp.</i> 2014.</p> <p>Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion <i>Stroke</i> 2004).</p>

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

---

No

---

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

---

---

### H. Re-use

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

No > Continue with question I.

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

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

No

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

### I. Repetition

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

not applicable

### J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Killing at the end of the procedures is necessary for the collection of tissues and material for further ex-vivo/in-vitro characterisation.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Animals will be terminally anaesthetized and undergo a cardiac perfusion protocol for the ex vivo study of brain tissue.

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

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

Naam van het project	nieuwe medicijnen tegen beroerte en dementie
NTS-identificatiecode	NTS-NL-360560 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	vasculaire dementie ischemische beroerte cerebrale bloedstroom farmacologie
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	In dit project testen we nieuwe nieuwe medicijnen voor de behandeling van een herseninfarct (beroerte) en van een specifiek type dementie (vasculaire dementie). We onderzoeken of de nieuwe medicijnen de doorbloeding in de hersenen verbetert. We onderzoeken meerdere soorten medicijnen in gezonde en zieke muismodellen, die op een verschillende manier de doorbloeding kunnen verbeteren. Het ene medicijn beïnvloedt de receptor AT1R, het andere het eiwit sGC.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	De nieuwe medicijnen kunnen mogelijk hersenschade door een beroerte of dementie beperken of vertragen.. Deze studie zal aantonen of dat het geval is in muismodellen. Als dat zo is, kan in de toekomst onderzoek worden gedaan waarbij deze nieuwe medicijnen worden vergeleken met de bestaande behandelen bij herseninfarcten en vasculaire dementie.

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Onderstaande procedures zullen bij sommige, maar niet bij alle diergroepen worden toegepast: bloedafname; een buisje in bloedvaten plaatsen; meten van de doorbloeding in de hersenen; toedienen van medicatie (oraal of injectie); operatie om de doorbloeding van de hersenen te verminderen of een beroerte te veroorzaken; verdoving/narcose om het dier te laten sterven.</p>									
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Procedures zoals bloedafname kunnen enkele minuten zorgen voor stress en lichte pijn. Ingrijpender procedures zoals operaties zullen matig ongerief veroorzaken: het dier wordt verdoofd en krijgt pijnstillers. Verder verwachten we verlies van lichaamsgewicht en verminderd gedrag (verandering in beweging en cognitie) bij dieren die een operatie ondergaan.</p>									
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p> <table border="1" data-bbox="799 689 1567 768"> <thead> <tr> <th data-bbox="799 689 991 768">Terminaal</th> <th data-bbox="991 689 1177 768">Licht</th> <th data-bbox="1177 689 1366 768">Matig</th> <th data-bbox="1366 689 1567 768">Ernstig</th> </tr> </thead> </table>				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Terminaal	Licht	Matig	Ernstig							
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p> <table border="1" data-bbox="799 1010 1567 1084"> <thead> <tr> <th data-bbox="799 1010 1051 1084">Hergebruikt</th> <th data-bbox="1051 1010 1303 1084">Teruggeplaatst</th> <th data-bbox="1303 1010 1567 1084">Geadopteerd</th> </tr> </thead> </table>				Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd		
Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd								
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren zullen aan het einde van de experimenten worden opgedood om het effect van de medicijnen op het hersenweefsel te kunnen onderzoeken.</p>									



## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>De doorbloeding van de hersenen kan op dit moment niet goed genoeg worden nagebootst in modellen waarbij geen levende dieren nodig zijn (in vitro modellen). Het is ook vereist om deze medicijnen op dieren te testen voordat ze bij patiënten worden getest.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Er zullen niet meer dieren worden gebruikt dan het aantal dat minimaal nodig is om betrouwbare uitspraken te kunnen over de werking van de nieuwe medicijnen. Dat aantal wordt berekend op basis van eerdere studies.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Er zullen maatregelen worden genomen voor zo weinig mogelijk pijn en ongerief bij de dieren. Milieuverrijking en sociale huisvesting zullen worden gedaan om het dierenwelzijn te verbeteren. Daarnaast zijn de diermodellen uitgekozen op basis van hun pathologische relevantie (de kenmerken van de dieren passen bij de ziekten die we onderzoeken), hoge reproduceerbaarheid en lage mortaliteit.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Volwassen muizen zijn geselecteerd voor deze studie omdat 1) een herseninfarct en vasculaire dementie goed kunnen worden veroorzaakt; 2) de doorbloeding van de hersenen goed in beeld is te brengen; 3) omdat ze klein zijn, het maakt het mogelijk om de hoeveelheid te gebruiken medicijnen te beperken; 4) er later genetische onderzoek uit te voeren door het maken van muizen die zijn ontworpen om bepaalde genen tot expressie te brengen. Onderzoek naar beroerte en dementie kan wel worden gedaan bij kleine knaagdieren/zoogdieren maar niet niet kan worden uitgevoerd bij ongewervelde dieren of vissen, omdat ze niet dezelfde ziekte krijgen</p>

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-10-2028
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

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







## Advies aan CCD

Datum 30 september 2022  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216338

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion  
 Aanvraagnummer: AVD202216338  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek

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

<p><b>Proces</b></p>    	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:          Over de bijlage:          - In de bijlage dierproeven onder B bij de diersoort is niet weergegeven waarom u voor de muis heeft gekozen als diersmodel. Kunt u onderbouwen waarom de door u gekozen soort het beste diersmodel is voor deze (en een eventuele vervolg-) studie?</p> <p>Over de NTS:          - In de NTS spreekt u over de receptor AT1R en het eiwit sGC. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.</p>			
<p><b>Naam proef</b></p>	<p><b>Diersoort</b></p>	<p><b>Stam</b></p>	<p><b>Aantal dieren</b></p>	<p><b>Herkomst</b></p>
<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b></p>				
	<p>Muizen (Mus musculus)</p>	<p>C57BL6/J</p>	<p>1.038</p>	<p>Dieren die voor onderzoek gefokt zijn</p>

# Overzicht van opmerkingen bij 11. AdviesNotaCCD\_5.1 lid2e 30-09-2022\_Met opmerkingen.pdf

---

Pagina: 1

---

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 11:48:30  
In de bijlage onder A verwijzen ze bij de statistiek naar 2 vorige aanvragen. Is deze aanvraag daar een rechtstreeks vervolg op of is dit echt een op zichzelf staande aanvraag? Ik heb bij de achtergrond namelijk niet gelezen dat dit een vervolg aanvraag is of wat er eerder door deze groep op dit gebied is bereikt.

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 11:05:38  
5.2 lid1 Ze hebben het over medicijnen en dat die eerst op dieren getest moeten worden voordat het in de mens gebruikt kan worden. 5.2 lid1

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 11:03:19  
bij het lezen van de NTS wordt me niet helemaal duidelijk waarom een deel van de dieren ernstig ongerief zal ondergaan. 5.2 lid1

Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 11:06:08  
En als je toch een nieuwe NTS opvraagt misschien even een algemene opmerking over typefouten en dergelijke want ik stoor mij eraan.

## **Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren**



### 3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Males will be used instead of females since the female sex steroid hormone estradiol exerts neuroprotective effects on the development of ischemic lesion, which could influence the outcome of our experiment. After menopause, the risk for stroke and dementia increase in women due to the decrease in the neuroprotective effects of estrogens. This would require to perform ovariectomy in the female mice for healthy and diseased models, significantly increasing the number of animals, considering also the additional drop-out due to the surgery. This would make the procedures unrealistic considering the number of groups to be studied. It has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study.

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

## **2 DEC advies**

<b>DEC-advies</b>  <sup>2</sup>	<p>Citaat vraag 2 DEC: Ernstig ongerief wordt verwacht bij 27% van de dieren &lt;-&gt; bij fundamenteel onderzoek geeft dit problemen ten aanzien van de proportionaliteit van het ongerief voor de dieren ten opzichte van het belang van het onderzoek. Is deze aanvraag wel fundamenteel onderzoek en niet (ook) translationeel onderzoek?</p> <p>Citaat antwoord 2 aanvrager: Our animal research proposal is fundamental as we aim to assess the physiological (in healthy animals) and pathological relevance (in diseased animals) of signaling pathways for the regulation of cerebral blood flow. It does not include other functional readouts to translate our findings to the human condition (e.g. cognitive behavior). Due to the nature of the pathology studied (stroke and dementia), the discomfort experienced by some animals can indeed be considered as severe as described in the corresponding Table of the application file.</p> <p>Citaat C18 (geslachten): De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De <span style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2h</span> is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken het noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager aangetoond dat het uitvoeren van</p>  <sup>1</sup>
---	---

## Pagina: 2

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 10:42:38  
5.2 lid1

---

Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 12:19:39  
je zou eventueel vraag 39 er ook bij kunnen nemen

het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een grotere variatie en dat dan er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1. Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?

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

- o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel
- o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor (toekomstige) patiënten bevorderd worden: substantieel voordeel.

De **5.1 lid 2h** is van mening dat de belangen van personen met cerebrovasculaire aandoeningen als herseninfarct en vasculaire dementie en hun naasten in het bijzonder, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, binnen het project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig tot ernstig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (o.a. bilaterale carotide arterie stenose (BCAS) of distale middelste cerebrale arterie occlusie (dMCAO), neurologische testen, vaatcannulatie, bloedflow metingen, toediening (orale gavage of via drinkwater) van farmaca, subcutane injecties, het aanbrengen van een osmotische minipomp, bloedafnames, en intraveneuze injecties) het leven met de gevolgen daarvan, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en aan het eind ervan worden opgeofferd.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verbeteren van de behandeling van vormen van herseninfarct (2e

vaakst voorkomende doodsoorzaak in 2019) en vasculaire dementie (ca 16 miljoen mensen wereldwijd) waarbij de kwaliteit van leven voor de patiënten ernstig wordt aangetast en de prognose momenteel ongunstig is. Het gaat hier om grote groepen patiënten. Vanwege het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, zal het project echter niet op korte termijn bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten. Dit laatste is van vele factoren afhankelijk die in deze fase niet te over- en voorzien zijn.

Dit onderzoek biedt perspectief op meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding en strikte toepassing van humane eindpunten, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag "Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?" bevestigend.

De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening weegt het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van uiteindelijk patiënten die leiden aan cerebrovasculaire aandoeningen, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel



blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De 5.1 lid2h is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De 5.1 lid2h is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de meerderheid van de 5.1 lid2h de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" als ethisch gerechtvaardigd. Eén lid is echter van mening dat de validiteit van voorgesteld onderzoek in relatie tot het doel beperkt is en dat dit in combinatie met het ernstige ongerief en de fundamentele doelstelling van het onderzoek ervoor zorgt dat de proportionaliteit van voorgesteld onderzoek in het geding is. Op basis van de mening van de meerderheid voorziet de 5.1 lid2h het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid is van mening dat het onderhavige onderzoeksvoorstel voorzien zou moeten worden van een negatief advies, omdat deze de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel trekt, de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide vindt, en het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk vindt.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:



Citaat:

- 27% van de dieren zal ernstig ongerief ondervinden, wat een ethisch discussiepunt is binnen een fundamenteel onderzoeksproject.
- De translatie naar de menselijke context in relatie tot de constructvaliditeit van het model voor herseninfarct.
- Er worden slechts dieren van één sekse gebruikt, omdat er nooit is gewerkt met (ge-ovariotomeerde) vrouwelijke muizen bij het toepassen van BCAS en dMCAO. Daardoor zouden de modellen eerst gevalideerd moeten worden bij gebruik van vrouwelijke muizen, wat een studie en expertise op zich is, die de onderzoekers aangeven niet in huis te hebben.

### 3 Kwaliteit DEC advies

#### Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

De CCD wilt u  edanken voor de duidelijke weergave van het minderheidsstandpunt van het ene DEC lid. 

ook de aangekaarte dilemma's zou ik benoemen

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke (post-acute phase) and vascular dementia.</p> <p>We will specifically assess the ability of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and in post-acute phase of ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions.</p> <p>Sub-objectives</p> <p>Aim 1: To study the impact of AT1R biased agonists on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) in healthy mice;</li><li>b) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis) ;</li></ul> <p>Aim 2: To study the impact of sGC stimulators/activators on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) in healthy mice;</li><li>c) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis).</li></ul>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Stroke  Estimates from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD 2010) ranked stroke as the second most common cause of death(1) and the third most common cause of disability worldwide in 2010(2). In 2019, stroke was still the second cause of death worldwide according to the World Health Organization (WHO Health report 2019). The treatment of acute ischemic stroke has undergone dramatic changes recently subsequent to the demonstrated efficacy of endovascular thrombectomy(57). The selection of patients for this therapy is however based on timely CT or MR imaging and should be initiated within 6 hours of stroke onset. Alternatively intravenous thrombolysis with tissue-type plasminogen activator remains the standard acute stroke therapy within the initial 3-4.5 hours after stroke onset(58). Overall, the therapeutic time window and eligibility criteria for both approaches remain limited and new therapeutic options are urgently needed to restore CBF in the ischemic and at-risk areas. To circumvent this temporal challenge, clinicians are in urgent need of treatments for sub-acute (&gt;6h) and post-acute/chronic management of stroke patients.</p> <p>Dementia  Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide, while nearly 10 million new cases are reported each year, with WHO estimations of 82 million cases in 2030 due to ageing(4). Out of all dementia cases, approximately 20% show VaD pathology(3). VaD causes the impairment of at least one cognitive domain that severely disrupts daily living. The treatment regime involves lifestyle interventions, control of vascular risk factors, and cognition enhancers that were originally developed for Alzheimer’s disease (AD)(59). Yet there is only limited evidence that any of these treatments prevent disease progression.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7: Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met farmacologische interventies, proefdiermodellen van cerebrovasculaire aandoeningen, wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V’s onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Frontiers in Neuroscience, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism en Hypertension Research.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

**3V's**

Vervanging

**3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:**

Citaat: There is currently no alternative approach allowing the study of cerebral blood flow. There is also no alternative suitable to replace models of stroke and cerebral hypoperfusion.

Replacement with human post-mortem material: human post-mortem samples are by definition late-stage pathological tissues that do not allow any functional and longitudinal studies

Replacement with human participants: it is important (and mandatory) to perform pre-clinical investigations to assess the validity of the therapeutic approach. Clinical trials are also not suitable for mechanistic understanding of the pathology and treatment. For example, a phase 0 clinical study is aimed at verifying the safety and assessing some pharmacokinetic parameters of a drug but not to solve fundamental research questions. One low, subtherapeutic, dose can be tested in a phase 0 thus limiting the investigations for the study of the regulation of the CBF.

Replacement with cells: beyond 2D cell work, 3D cell culture models that includes flow are not capable of reproducing the complexity of the cerebral cellular environment. Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies with capillaries (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents). We are already investigating the effect of some compounds on middle cerebral arteries mounted in arteriographs. This is useful to test several compounds at multiple doses, investigate some mechanisms but it concerns large vessels (>100 µm) and it is not very informative for the study of microcirculation (~ 6-10 µm) as the expression of receptors, enzymes, ... differ a lot between vascular beds. Therefore our ex vivo investigations – although useful – can not replace the use of animals for the present project. There is also no model that allows the study of neurovascular coupling (i.e. the translation of neuronal activity into a vasodilatory reaction).


Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: The number of animals needed for this study has been calculated based on previous studies to ensure a proper statistical power is reached to assess differences in the primary readout parameters. Group size calculation will be performed prior to every working protocol as described in section A of the present appendix.</p>
Verfijnen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: In addition to measures taken to minimize pain and discomfort, environmental enrichment and social housing will be done to improve animal's welfare. Furthermore the animal models have been chosen after careful consideration of alternative models and it has been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:</p> <p>Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. J. Vis. Exp. 2014.</p> <p>Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion Stroke 2004).</p>
<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b> De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>	HEP: 5% sham groep; 15% BCAS en dMCOA groep	Citaat: General considerations – humane endpoints for healthy mice groups: Humane endpoints will be considered if animals exhibit signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented by trained and experienced team members during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress reach humane endpoints, euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). A cumulative welfare score >6 or one criteria scored 3 will be considered a humane endpoint. Each criteria (awareness, posture, movement, social behavior, fascial expression, coat condition, nest building, breathing pattern) is scored from 0 to 3 (0=normal; 3= severely altered).Furthermore, a strong reduction in body weight will also be considered a humane endpoint according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/ or rehydration,



		<p>or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.</p> <p>Procedure/group-dependent considerations for the BCAS/Sham and dMCAO/Sham groups: After surgery, the Garcia neurological test will be used 2x/week to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>. The following criteria will be considered as humane endpoints: - a weight loss of &gt;20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>; - a Garcia score <math>\leq 10</math> (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will be considered a humane endpoint for the BCAS/Sham groups - a Garcia score <math>\leq 7</math> will be considered a humane endpoint for the dMCAO/Sham groups</p> <p>Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .</p>
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 72,0% Matig 28,0% Licht	 <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">1</span>

## 5 Samenvatting

# 5.2 lid1

Er worden in het project alleen mannelijke dieren gebruikt. Volgens de DEC heeft de aanvrager voldoende onderbouwd waarom alleen mannelijke dieren

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 11:56:33

---

dit klopt niet met de bijlage (72 matig en 28 licht, en daarom wilde MAUS ernstig ongerief ook niet invullen ;)).

Overigens zeggen ze onder F bovenaan: In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.

Deze aantallen zijn veel hoger dan de 1038 dieren die ze aanvragen dus ik zou ze vragen dit aan te passen naar de daadwerkelijke aantallen en percentages.

worden ingezet. **5.2 lid1**

**1** Een DEC-lid vindt de onderbouwing van voor het gebruik van slechts één sekse niet valide. Daarnaast trekt dit DEC-lid de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel, en vindt het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk. Om deze reden zou dat het onderhavige onderzoeksvoorstel voorzien moeten worden van een negatief advies, waardoor het uitgebrachte advies van de DEC tot stand is gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. **2**

De aanvrager geeft aan dat 2% van de dieren ernstig ongerief zullen ervaren. Volgens de DEC is het ongerief realistisch ingeschat. **5.2 lid1**  
**5.1 lid2e** Vanwege het cumulatief ernstige ongerief in het projectvoorstel, wordt een voorwaarde in de vorm van een beoordeling achteraf aan de vergunning verbonden.

#### **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

# **5.2 lid1**

#### *Beoordeling achteraf*


Op dit project is een beoordeling achteraf van toepassing. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.


#### **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

## Pagina: 13

---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Markering    Datum: 30-9-2022 10:57:59  
5.2 lid1    Ik zou beginnen met dat het DEC advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, en daaronder de argumenten van het ene DEC lid benoemen.

---

 Nummer: 2    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Notitie Datum: 30-9-2022 11:58:37  
28 volgens mij



# Advies aan CCD

Datum 30 september 2022  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216338

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion  
Aanvraagnummer: AVD202216338  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

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

<b>Proces</b>	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: Over de bijlage: - In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de groepsgrootte gebaseerd zijn op de studie AVD 5.1 lid2h en AVD 5.1 lid2h. Kunt u aangeven of deze studie een vervolg is op deze aanvragen? Zo ja, welke resultaten/inzichten hebben voorgaande studie gegeven?</p> <p>- In de bijlage dierproeven onder B bij de diersoort is niet weergegeven waarom u voor de muis heeft gekozen als diemodel. Kunt u onderbouwen waarom de door u gekozen soort het beste diemodel is voor deze (en een eventuele vervolg-) studie?</p> <p>- In de bijlage dierproeven onder F geeft u aan dat 'In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.'. Deze weergave komt niet overeen met de conclusie onderin het stuk bij F en de aangevraagde aantallen onder B. Kunt u deze zin in overeenstemming brengen met de rest van de tekst?</p> <p>Over de NTS: - In de NTS spreekt u over de receptor AT1R en het eiwit sGC. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.</p> <p>- In de NTS geeft u onder de potentiële voordelen aan dat de nieuwe</p>
---------------	--

	<p>medicijnen in de nabije toekomst bij mensen getest gaan worden. Hierdoor wekt u de indruk dat het om translationeel onderzoek gaat. U geeft als projectdoel aan dat het om fundamenteel onderzoek gaat. Deze kant wordt nu onderbelicht. Kunt u dit toevoegen aan de NTS?</p> <p>- Bij de verwachte gevolgen/nadelige effecten in de NTS spreekt u van licht en matig ongerief. Kunt u aan het algemeen publiek uitleggen hoe bij uw proeven de dieren echter ernstig ongerief ervaren?</p> <p>- Algemene opmerking NTS: Kunt u deze nalezen op typ en interpunctie fouten?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>				
	Muizen (Mus musculus)	C57BL6/J	1.038	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

#### **Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren**

##### 3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion

Muizen (Mus musculus)

Citaat: Males will be used instead of females since the female sex steroid hormone estradiol exerts neuroprotective effects on the development of ischemic lesion, which could influence the outcome of our experiment. After menopause, the risk for stroke and dementia increase in women due to the decrease in the neuroprotective effects of estrogens. This would require to perform ovariectomy in the female mice for healthy and diseased models, significantly increasing the number of animals, considering also the additional drop-out due to the surgery. This would make the procedures unrealistic considering the number of groups to be studied. It has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.</li> <li>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</li> </ul>
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat vraag 2 DEC: Ernstig ongerief wordt verwacht bij 27% van de dieren &lt;-&gt; bij fundamenteel onderzoek geeft dit problemen ten aanzien van de proportionaliteit van het ongerief voor de dieren ten opzichte van het belang van het onderzoek. Is deze aanvraag wel fundamenteel onderzoek en niet (ook) translationeel onderzoek?</p> <p>Citaat antwoord 2 aanvrager: Our animal research proposal is fundamental as we aim to assess the physiological (in healthy animals) and pathological relevance (in diseased animals) of signaling pathways for the regulation of cerebral blood flow. It does not include other functional readouts to translate our findings to the human condition (e.g. cognitive behavior). Due to the nature of the pathology studied (stroke and dementia), the discomfort experienced by some animals can indeed be considered as severe as described in the corresponding Table of the application file.</p> <p>Citaat vraag 39 DEC: Met de zinsnede 'The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.' lijkt uw onderzoeksaanvraag meer capaciteits- dan vraaggestuurd. Gezien het feit dat 27% van de dieren naar verwachting ernstig ongerief ondergaat worden de go/no go criteria en onderbouwing van de dieraantallen van eminent belang. Naar de mening van de <b>5.1 lid2h</b> dienen deze beide aspecten te worden aangescherpt. Als go/no go criterium zou overwogen kunnen worden als uitgangspunt te nemen het effect van het meest veelbelovende farmacon per klasse in plaats van het streven naar het testen van alle beschikbare farmaca per klasse. Graag daarover uw mening.</p> <p>Citaat antwoord 39 aanvrager: We understand the concern of the <b>5.1 lid2h</b> regarding the proportion of animals with severe discomfort. We would like to highlight that we have adapted the number of animals by refining our group size calculation and dropout rates in Sham mice (1038 mice instead of 1800 mice). In addition, we would like to also remind that the severe discomfort is purely related to the severity of the model (stroke) which is inherent to the project. Furthermore, we plan indeed to start our investigations with the most promising "lead" compounds per class based on previous and ongoing studies (in vitro and/or ex vivo) see previous answers. After analyzing the data obtained with one compound, we will summarize our findings and decide/or not/ to plan the study of another compound in that class in the working protocol that will be assessed by the animal welfare body. The decision to study a second and a third compound per class will not be based on the efficacy of the tested</p>
-------------------	--

drug (yes/no as a go/no-go criteria) but rather on the information gained with the previous tested compound (e.g. choice of a compound that has a different pharmacokinetic profile or higher brain distribution). We think therefore that it is not possible to assign such go/no-go point as the decision will not be based on a binary criteria/parameter.

Citaat C18 (geslachten): De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren.

De 5.1 lid2h is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken het noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager aangetoond dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een grotere variatie en dat dan er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1. Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?

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

- o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel
- o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor (toekomstige) patiënten bevorderd worden: substantieel voordeel.

De 5.1 lid2h is van mening dat de belangen van personen met cerebrovasculaire aandoeningen als herseninfarct en vasculaire dementie en hun naasten in het bijzonder, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, binnen het project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig tot ernstig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De



integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (o.a. bilaterale carotide arterie stenose (BCAS) of distale middelste cerebrale arterie occlusie (dMCAO), neurologische testen, vaatcannulatie, bloedflow metingen, toediening (orale gavage of via drinkwater) van farmaca, subcutane injecties, het aanbrengen van een osmotische minipomp, bloedafnames, en intraveneuze injecties) het leven met de gevolgen daarvan, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en aan het eind ervan worden opgeofferd.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verbeteren van de behandeling van vormen van herseninfarct (2e vaakst voorkomende doodsoorzaak in 2019) en vasculaire dementie (ca 16 miljoen mensen wereldwijd) waarbij de kwaliteit van leven voor de patiënten ernstig wordt aangetast en de prognose momenteel ongunstig is. Het gaat hier om grote groepen patiënten. Vanwege het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, zal het project echter niet op korte termijn bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten. Dit laatste is van vele factoren afhankelijk die in deze fase niet te over- en voorzien zijn.

Dit onderzoek biedt perspectief op meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding en strikte toepassing van humane eindpunten, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag "Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?" bevestigend.

De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren.

Naar haar mening weegt het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van uiteindelijk patiënten die leiden aan cerebrovasculaire aandoeningen, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de meerderheid van de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" als ethisch gerechtvaardigd. Eén lid is echter van mening dat de validiteit van voorgesteld onderzoek in relatie tot het doel beperkt is en dat dit in combinatie met het ernstige ongerief en de fundamentele doelstelling van het onderzoek ervoor zorgt dat de proportionaliteit van voorgesteld onderzoek in het geding is. Op basis van de mening van de meerderheid voorziet de **5.1 lid2h** het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: Het uitgebrachte **5.1 lid2h** advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid is van mening dat het onderhavige onderzoeksvoorstel voorzien zou moeten worden van een negatief advies, omdat deze de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel trekt, de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide vindt, en het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk vindt.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat:

- 27% van de dieren zal ernstig ongerief ondervinden, wat een ethisch discussiepunt is binnen een fundamenteel onderzoeksproject.
- De translatie naar de menselijke context in relatie tot de constructvaliditeit van het model voor herseninfarct.
- Er worden slechts dieren van één sekse gebruikt, omdat er nooit is gewerkt met (ge-ovariotomeerde) vrouwelijke muizen bij het toepassen van BCAS en dMCAO. Daardoor zouden de modellen eerst gevalideerd moeten worden bij gebruik van vrouwelijke muizen, wat een studie en expertise op zich is, die de onderzoekers aangeven niet in huis te hebben.

### 3 Kwaliteit DEC advies

#### Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

De CCD wilt u bedanken voor de duidelijke weergave van het minderheidsstandpunt van het ene DEC lid. Ook de aangekaarte dilemma's heeft u duidelijk weergegeven.

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat: The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke (post-acute phase) and vascular dementia.</p> <p>We will specifically assess the ability of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and in post-acute phase of ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions.</p> <p>Sub-objectives</p> <p>Aim 1: To study the impact of AT1R biased agonists on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) in healthy mice;</li><li>b) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis) ;</li></ul> <p>Aim 2: To study the impact of sGC stimulators/activators on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) in healthy mice;</li><li>c) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis).</li></ul>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Stroke</p> <p>Estimates from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD 2010) ranked stroke as the second most common cause of death(1) and the third most common cause of disability worldwide in 2010(2). In 2019, stroke was still the second cause of death worldwide according to the World Health Organization (WHO Health report 2019). The treatment of acute ischemic stroke has undergone dramatic changes recently subsequent to the demonstrated efficacy of endovascular thrombectomy(57). The selection of patients for this therapy is however based on timely CT or MR imaging and should be initiated within 6 hours of stroke onset. Alternatively intravenous thrombolysis with tissue-type plasminogen activator remains the standard acute stroke therapy within the initial 3-4.5 hours after stroke onset(58). Overall, the therapeutic time window and eligibility criteria for both approaches remain limited and new therapeutic options are urgently needed to restore CBF in the ischemic and at-risk areas. To circumvent this temporal challenge, clinicians are in urgent need of treatments for sub-acute (&gt;6h) and post-acute/chronic management of stroke patients.</p> <p>Dementia</p> <p>Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide, while nearly 10 million new cases are reported each year, with WHO estimations of 82 million cases in 2030 due to ageing(4). Out of all dementia cases, approximately 20% show VaD pathology(3). VaD causes the impairment of at least one cognitive domain that severely disrupts daily living. The treatment regime involves lifestyle interventions, control of vascular risk factors, and cognition enhancers that were originally developed for Alzheimer’s disease (AD)(59). Yet there is only limited evidence that any of these treatments prevent disease progression.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7: Voor zover de <b>5.1 lid2h</b> kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met farmacologische interventies, proefdiermodellen van cerebrovasculaire aandoeningen, wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V’s onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Frontiers in Neuroscience, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism en Hypertension Research.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

### 3V's

Vervanging	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: There is currently no alternative approach allowing the study of cerebral blood flow. There is also no alternative suitable to replace models of stroke and cerebral hypoperfusion.</p> <p>Replacement with human post-mortem material: human post-mortem samples are by definition late-stage pathological tissues that do not allow any functional and longitudinal studies</p> <p>Replacement with human participants: it is important (and mandatory) to perform pre-clinical investigations to assess the validity of the therapeutic approach. Clinical trials are also not suitable for mechanistic understanding of the pathology and treatment. For example, a phase 0 clinical study is aimed at verifying the safety and assessing some pharmacokinetic parameters of a drug but not to solve fundamental research questions. One low, subtherapeutic, dose can be tested in a phase 0 thus limiting the investigations for the study of the regulation of the CBF.</p> <p>Replacement with cells: beyond 2D cell work, 3D cell culture models that includes flow are not capable of reproducing the complexity of the cerebral cellular environment. Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies with capillaries (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents). We are already investigating the effect of some compounds on middle cerebral arteries mounted in arteriographs. This is useful to test several compounds at multiple doses, investigate some mechanisms but it concerns large vessels (&gt;100 µm) and it is not very informative for the study of microcirculation (~ 6-10 µm) as the expression of receptors, enzymes, ... differ a lot between vascular beds. Therefore our ex vivo investigations – although useful – can not replace the use of animals for the present project. There is also no model that allows the study of neurovascular coupling (i.e. the translation of neuronal activity into a vasodilatory reaction).</p>
------------	--

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: The number of animals needed for this study has been calculated based on previous studies to ensure a proper statistical power is reached to assess differences in the primary readout parameters. Group size calculation will be performed prior to every working protocol as described in section A of the present appendix.</p>
Verfijnen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: In addition to measures taken to minimize pain and discomfort, environmental enrichment and social housing will be done to improve animal's welfare. Furthermore the animal models have been chosen after careful consideration of alternative models and it has been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:</p> <p>Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. J. Vis. Exp. 2014.</p> <p>Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion Stroke 2004).</p>
<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b> De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>	HEP: 5% sham groep; 15% BCAS en dMCOA groep	Citaat: General considerations – humane endpoints for healthy mice groups: Humane endpoints will be considered if animals exhibit signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented by trained and experienced team members during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress reach humane endpoints, euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). A cumulative welfare score >6 or one criteria scored 3 will be considered a humane endpoint. Each criteria (awareness, posture, movement, social behavior, fascial expression, coat condition, nest building, breathing pattern) is scored from 0 to 3 (0=normal; 3= severely altered).Furthermore, a strong reduction in body weight will also be considered a humane endpoint according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/ or rehydration,



		<p>or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.</p> <p>Procedure/group-dependent considerations for the BCAS/Sham and dMCAO/Sham groups: After surgery, the Garcia neurological test will be used 2x/week to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>.</p> <p>The following criteria will be considered as humane endpoints:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- a weight loss of &gt;20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>;</li> <li>- a Garcia score <math>\leq</math> 10 (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will be considered a humane endpoint for the BCAS/Sham groups</li> <li>- a Garcia score <math>\leq</math> 7 will be considered a humane endpoint for the dMCAO/Sham groups</li> </ul> <p>Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .</p>
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 28,0% Ernstig 72,0% Matig	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1



Er worden in het project alleen mannelijke dieren gebruikt. Volgens de DEC heeft de aanvrager voldoende onderbouwd waarom alleen mannelijke dieren

worden ingezet. 5.2 lid1

Het uitgebrachte advies van de DEC is een meerderheidsstandpunt. Een DEC-lid geeft een negatief advies. Dit DEC-lid trekt de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel, vindt de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide, en vindt het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk.

De aanvrager geeft aan dat 28% van de dieren ernstig ongerief zullen ervaren. Volgens de DEC is het ongerief realistisch ingeschat. 5.2 lid1

Vanwege het cumulatief ernstige ongerief in het projectvoorstel, wordt een voorwaarde in de vorm van een beoordeling achteraf aan de vergunning verbonden.

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Aan:** 5.1 lid2e 5.1 lid2h  
**Cc:** 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202216338  
**Datum:** vrijdag 30 september 2022 14:25:11

---

Geachte 5.1 lid2e,

Op 17-08-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202216338. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

### **Niet technische samenvatting**

- In de NTS spreekt u over de receptor AT1R en het eiwit sGC. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.

- In de NTS geeft u onder de potentiële voordelen aan dat de nieuwe medicijnen in de nabije toekomst bij mensen getest gaan worden. Hierdoor wekt u de indruk dat het om translationeel onderzoek gaat. U geeft als projectdoel aan dat het om fundamenteel onderzoek gaat. Deze kant wordt nu onderbelicht. Kunt u dit toevoegen aan de NTS?

- Bij de verwachte gevolgen/nadelige effecten in de NTS spreekt u van licht en matig ongerief. Kunt u aan het algemeen publiek uitleggen hoe bij uw proeven de dieren echter ernstig ongerief ervaren?

- Algemene opmerking NTS: Kunt u deze nalezen op typ en interpunctie fouten?

### **Onduidelijkheden**

- In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de groepsgrootte gebaseerd zijn op de studie AVD<sup>5.1 lid2h</sup> en AVD<sup>5.1 lid2h</sup>. Kunt u aangeven of deze studie een vervolg is op deze aanvragen? Zo ja, welke resultaten/inzichten hebben voorgaande studie gegeven?

- In de bijlage dierproeven onder B bij de diersoort is niet weergegeven waarom u voor de muis heeft gekozen als diersmodel. Kunt u onderbouwen waarom de door u gekozen soort het beste diersmodel is voor deze (en een eventuele vervolg-) studie?

- In de bijlage dierproeven onder F geeft u aan dat 'In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.'. Deze weergave komt niet overeen met de conclusie onderin het stuk bij F en de aangevraagde aantallen onder B. Kunt u deze zin in overeenstemming brengen met de rest van de tekst?

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Zoals in de factuur staat, moeten de leges binnen 30 dagen door ons zijn ontvangen. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om op deze vragen te reageren. Als u echter uiterlijk 13 oktober op deze vragen kunt reageren, kunnen uw antwoorden in de eerstvolgende CCD vergadering van 14 oktober worden ingebracht bij de bespreking van uw aanvraag.

### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

### **5.1 lid2e**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



# Advies aan CCD

**B**

Datum 06 oktober 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216338

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion  
Aanvraagnummer: AVD202216338  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

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

<b>Proces</b>	<p>De volgende vraag was gesteld aan de DEC:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Bij de ethische afweging in uw advies schrijft u dat het ongerief van de proef 73% matig en 27% ernstig is. In de bijlage dierproeven blijkt de verhouding 72% matig en 28% ernstig. We gaan ervan uit dat het hier een kennelijke verschrijving betreft. Kunt u aangeven of uw ethische afweging hiermee veranderd?</li></ul> <p>Antwoord van de DEC: Deze verschrijving maakt niets uit voor de ethische afweging.</p> <p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <p>Over de bijlage:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de groepsgrootte gebaseerd zijn op de studie AVD 5.1 lid2h en AVD 5.1 lid2h. Kunt u aangeven of deze studie een vervolg is op deze aanvragen? Zo ja, welke resultaten/inzichten hebben voorgaande studie gegeven?</li><li>- In de bijlage dierproeven onder B bij de diersoort is niet weergegeven waarom u voor de muis heeft gekozen als diermodel. Kunt u onderbouwen waarom de door u gekozen soort het beste diermodel is voor deze (en een eventuele vervolg-) studie?</li><li>- In de bijlage dierproeven onder F geeft u aan dat 'In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.'. Deze weergave komt niet overeen met de conclusie onderin het stuk bij F en de aangevraagde</li></ul>
---------------	---

	<p>aantallen onder B. Kunt u deze zin in overeenstemming brengen met de rest van de tekst?</p> <p>Over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- In de NTS spreekt u over de receptor AT1R en het eiwit sGC. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.</li> <li>- In de NTS geeft u onder de potentiële voordelen aan dat de nieuwe medicijnen in de nabije toekomst bij mensen getest gaan worden. Hierdoor wekt u de indruk dat het om translationeel onderzoek gaat. U geeft als projectdoel aan dat het om fundamenteel onderzoek gaat. Deze kant wordt nu onderbelicht. Kunt u dit toevoegen aan de NTS?</li> <li>- Bij de verwachte gevolgen/nadelige effecten in de NTS spreekt u van licht en matig ongerief. Kunt u aan het algemeen publiek uitleggen hoe bij uw proeven de dieren echter ernstig ongerief ervaren?</li> <li>- Algemene opmerking NTS: Kunt u deze nalezen op typ en interpunctie fouten?</li> </ul>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>				
	Muizen (Mus musculus)	C57BL6/J	1.038	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Males will be used instead of females since the female sex steroid hormone estradiol exerts neuroprotective effects on the development of ischemic lesion, which could influence the outcome of our experiment. After menopause, the risk for stroke and dementia increase in women due to the decrease in the neuroprotective effects of estrogens. This would require to perform ovariectomy in the female mice for healthy and diseased models, significantly increasing the number of animals, considering also the additional drop-out due to the surgery. This would make the procedures unrealistic considering the number of groups to be studied. It has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.</li><li>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</li></ul>
--	---

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat vraag 2 DEC: Ernstig ongerief wordt verwacht bij 27% van de dieren &lt;-&gt; bij fundamenteel onderzoek geeft dit problemen ten aanzien van de proportionaliteit van het ongerief voor de dieren ten opzichte van het belang van het onderzoek. Is deze aanvraag wel fundamenteel onderzoek en niet (ook) translationeel onderzoek?</p> <p>Citaat antwoord 2 aanvrager: Our animal research proposal is fundamental as we aim to assess the physiological (in healthy animals) and pathological relevance (in diseased animals) of signaling pathways for the regulation of cerebral blood flow. It does not include other functional readouts to translate our findings to the human condition (e.g. cognitive behavior). Due to the nature of the pathology studied (stroke and dementia), the discomfort experienced by some animals can indeed be considered as severe as described in the corresponding Table of the application file.</p> <p>Citaat vraag 39 DEC: Met de zinsnede 'The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.' lijkt uw onderzoeksaanvraag meer capaciteits- dan vraaggestuurd. Gezien het feit dat 27% van de dieren naar verwachting ernstig ongerief ondergaat worden de go/no go criteria en onderbouwing van de dieraantallen van</p>
-------------------	---

eminent belang. Naar de mening van de **5.1 lid2h** dienen deze beide aspecten te worden aangescherpt. Als go/no go criterium zou overwogen kunnen worden als uitgangspunt te nemen het effect van het meest veelbelovende farmacon per klasse in plaats van het streven naar het testen van alle beschikbare farmaca per klasse. Graag daarover uw mening.

Citaat antwoord 39 aanvrager: We understand the concern of the **5.1 lid2h** regarding the proportion of animals with severe discomfort. We would like to highlight that we have adapted the number of animals by refining our group size calculation and dropout rates in Sham mice (1038 mice instead of 1800 mice). In addition, we would like to also remind that the severe discomfort is purely related to the severity of the model (stroke) which is inherent to the project. Furthermore, we plan indeed to start our investigations with the most promising "lead" compounds per class based on previous and ongoing studies (in vitro and/or ex vivo) see previous answers. After analyzing the data obtained with one compound, we will summarize our findings and decide/or not/ to plan the study of another compound in that class in the working protocol that will be assessed by the animal welfare body. The decision to study a second and a third compound per class will not be based on the efficacy of the tested drug (yes/no as a go/no-go criteria) but rather on the information gained with the previous tested compound (e.g. choice of a compound that has a different pharmacokinetic profile or higher brain distribution). We think therefore that it is not possible to assign such go/no-go point as the decision will not be based on a binary criteria/parameter.

Citaat C18 (geslachten): De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken het noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager aangetoond dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een grotere variatie en dat dan er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1. Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de



aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?

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

- o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel
- o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor (toekomstige) patiënten bevorderd worden: substantieel voordeel.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van personen met cerebrovasculaire aandoeningen als herseninfarct en vasculaire dementie en hun naasten in het bijzonder, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, binnen het project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig tot ernstig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (o.a. bilaterale carotide arterie stenose (BCAS) of distale middelste cerebrale arterie occlusie (dMCAO), neurologische testen, vaatcannulatie, bloedflow metingen, toediening (orale gavage of via drinkwater) van farmaca, subcutane injecties, het aanbrengen van een osmotische minipomp, bloedafnames, en intraveneuze injecties) het leven met de gevolgen daarvan, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en aan het eind ervan worden opgeofferd.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verbeteren van de behandeling van vormen van herseninfarct (2e vaakst voorkomende doodsoorzaak in 2019) en vasculaire dementie (ca 16 miljoen mensen wereldwijd) waarbij de kwaliteit van leven voor de patiënten ernstig wordt aangetast en de prognose momenteel ongunstig is. Het gaat hier om grote groepen patiënten. Vanwege het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, zal het project echter niet op korte termijn bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten. Dit laatste is van vele factoren afhankelijk die in deze fase niet te over- en voorzien zijn.

Dit onderzoek biedt perspectief op meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven

verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding en strikte toepassing van humane eindpunten, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag "Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?" bevestigend.

De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening weegt het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van uiteindelijk patiënten die leiden aan cerebrovasculaire aandoeningen, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de meerderheid van de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" als ethisch gerechtvaardigd. Eén lid is echter van mening dat de validiteit van voorgesteld onderzoek in relatie tot het doel beperkt is en dat dit in combinatie met het ernstige ongerief en de fundamentele doelstelling van het onderzoek ervoor zorgt dat de proportionaliteit van voorgesteld onderzoek in het geding is. Op basis van de mening van de meerderheid voorziet de **5.1 lid2h** het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: Het uitgebrachte **5.1 lid2h** advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid is van mening dat het onderhavige onderzoeksvoorstel voorzien zou moeten worden van een negatief advies, omdat deze de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel trekt, de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide vindt, en het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk vindt.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat:

- 27% van de dieren zal ernstig ongerief ondervinden, wat een ethisch discussiepunt is binnen een fundamenteel onderzoeksproject.
- De translatie naar de menselijke context in relatie tot de constructvaliditeit van het model voor herseninfarct.
- Er worden slechts dieren van één sekse gebruikt, omdat er nooit is gewerkt met (ge-ovariotomeerde) vrouwelijke muizen bij het toepassen van BCAS en dMCAO. Daardoor zouden de modellen eerst gevalideerd moeten worden bij gebruik van vrouwelijke muizen, wat een studie en

	expertise op zich is, die de onderzoekers aangeven niet in huis te hebben.
--	--

**3 Kwaliteit DEC advies**

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD wilt u bedanken voor de duidelijke weergave van het minderheidsstandpunt van het ene DEC lid. Ook de aangekaarte dilemma's heeft u duidelijk weergegeven.</p>	

**4 Inhoudelijke beoordeling**

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke (post-acute phase) and vascular dementia.</p> <p>We will specifically assess the ability of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and in post-acute phase of ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions.</p> <p>Sub-objectives</p> <p>Aim 1: To study the impact of AT1R biased agonists on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) in healthy mice;</li> <li>b) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis) ;</li> </ul> <p>Aim 2: To study the impact of sGC stimulators/activators on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) in healthy mice;</li> <li>c) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis).</li> </ul>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Stroke</p> <p>Estimates from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD 2010) ranked stroke as the second most common cause of death(1) and the third most common cause of disability worldwide in 2010(2). In 2019, stroke was still the second cause of death worldwide according to the World Health Organization (WHO Health report 2019). The treatment of acute ischemic stroke has undergone dramatic changes recently subsequent to the demonstrated efficacy of endovascular thrombectomy(57). The selection of patients for this therapy is however based on timely CT or MR imaging and should be initiated within 6 hours of stroke onset. Alternatively intravenous thrombolysis with tissue-type plasminogen activator remains the standard acute stroke therapy within the initial 3-4.5 hours after stroke onset(58). Overall, the therapeutic time window and eligibility criteria for both approaches remain limited and new therapeutic options are urgently needed to restore CBF in the ischemic and at-risk areas. To circumvent this temporal challenge, clinicians are in urgent need of treatments for sub-acute (&gt;6h) and post-acute/chronic management of stroke patients.</p> <p>Dementia</p> <p>Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide, while nearly 10 million new cases are reported each year, with WHO estimations of 82 million cases in 2030 due to ageing(4). Out of all dementia cases, approximately 20% show VaD pathology(3). VaD causes the impairment of at least one cognitive domain that severely disrupts daily living. The treatment regime involves lifestyle interventions, control of vascular risk factors, and cognition enhancers that were originally developed for Alzheimer’s disease (AD)(59). Yet there is only limited evidence that any of these treatments prevent disease progression.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7: Voor zover de <b>5.1 lid2h</b> kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met farmacologische interventies, proefdiermodellen van cerebrovasculaire aandoeningen, wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V’s onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Frontiers in Neuroscience, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism en Hypertension Research.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

### 3V's

Vervanging	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: There is currently no alternative approach allowing the study of cerebral blood flow. There is also no alternative suitable to replace models of stroke and cerebral hypoperfusion.</p> <p>Replacement with human post-mortem material: human post-mortem samples are by definition late-stage pathological tissues that do not allow any functional and longitudinal studies</p> <p>Replacement with human participants: it is important (and mandatory) to perform pre-clinical investigations to assess the validity of the therapeutic approach. Clinical trials are also not suitable for mechanistic understanding of the pathology and treatment. For example, a phase 0 clinical study is aimed at verifying the safety and assessing some pharmacokinetic parameters of a drug but not to solve fundamental research questions. One low, subtherapeutic, dose can be tested in a phase 0 thus limiting the investigations for the study of the regulation of the CBF.</p> <p>Replacement with cells: beyond 2D cell work, 3D cell culture models that includes flow are not capable of reproducing the complexity of the cerebral cellular environment. Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies with capillaries (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents). We are already investigating the effect of some compounds on middle cerebral arteries mounted in arteriographs. This is useful to test several compounds at multiple doses, investigate some mechanisms but it concerns large vessels (&gt;100 µm) and it is not very informative for the study of microcirculation (~ 6-10 µm) as the expression of receptors, enzymes, ... differ a lot between vascular beds. Therefore our ex vivo investigations – although useful – can not replace the use of animals for the present project. There is also no model that allows the study of neurovascular coupling (i.e. the translation of neuronal activity into a vasodilatory reaction).</p>
------------	--

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: The number of animals needed for this study has been calculated based on previous studies to ensure a proper statistical power is reached to assess differences in the primary readout parameters. Group size calculation will be performed prior to every working protocol as described in section A of the present appendix.</p>
Verfijnen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: In addition to measures taken to minimize pain and discomfort, environmental enrichment and social housing will be done to improve animal's welfare. Furthermore the animal models have been chosen after careful consideration of alternative models and it has been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:</p> <p>Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. J. Vis. Exp. 2014.</p> <p>Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion Stroke 2004).</p>
<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b> De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>	HEP: 5% sham groep; 15% BCAS en dMCOA groep	Citaat: General considerations – humane endpoints for healthy mice groups: Humane endpoints will be considered if animals exhibit signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented by trained and experienced team members during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress reach humane endpoints, euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). A cumulative welfare score >6 or one criteria scored 3 will be considered a humane endpoint. Each criteria (awareness, posture, movement, social behavior, fascial expression, coat condition, nest building, breathing pattern) is scored from 0 to 3 (0=normal; 3= severely altered).Furthermore, a strong reduction in body weight will also be considered a humane endpoint according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/ or rehydration,



		<p>or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.</p> <p>Procedure/group-dependent considerations for the BCAS/Sham and dMCAO/Sham groups:  After surgery, the Garcia neurological test will be used 2x/week to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>.</p> <p>The following criteria will be considered as humane endpoints:  - a weight loss of &gt;20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption).  N.B.: Following surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>;  - a Garcia score <math>\leq 10</math> (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will be considered a humane endpoint for the BCAS/Sham groups  - a Garcia score <math>\leq 7</math> will be considered a humane endpoint for the dMCAO/Sham groups</p> <p>Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .</p>
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 28,0% Ernstig 72,0% Matig	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

Er worden in het project alleen mannelijke dieren gebruikt. Volgens de DEC heeft de aanvrager voldoende onderbouwd waarom alleen mannelijke dieren

worden ingezet. 5.2 lid1 [redacted].

Het uitgebrachte advies van de DEC is een meerderheidsstandpunt. Een DEC-lid geeft een negatief advies. Dit DEC-lid trekt de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel, vindt de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide, en vindt het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk.

De aanvrager geeft aan dat 28% van de dieren ernstig ongerief zullen ervaren. Volgens de DEC is het ongerief realistisch ingeschat. 5.2 lid1 [redacted]. Vanwege het cumulatief ernstige ongerief in het projectvoorstel, wordt een voorwaarde in de vorm van een beoordeling achteraf aan de vergunning verbonden.

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning** 5.2 lid1 [redacted]

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



# Advies aan CCD

**B**

Datum 17 oktober 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216338

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion  
Aanvraagnummer: AVD202216338  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

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

<b>Proces</b>	<p>De volgende vraag was gesteld aan de DEC:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Bij de ethische afweging in uw advies schrijft u dat het ongerief van de proef 73% matig en 27% ernstig is. In de bijlage dierproeven blijkt de verhouding 72% matig en 28% ernstig. We gaan ervan uit dat het hier een kennelijke verschrijving betreft. Kunt u aangeven of uw ethische afweging hiermee veranderd?</li></ul> <p>Antwoord van de DEC: Deze verschrijving maakt niets uit voor de ethische afweging.</p> <p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <p>Over de bijlage:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de groepsgrootte gebaseerd zijn op de studie AVD 5.1 lid2h en AVD 5.1 lid2h. Kunt u aangeven of deze studie een vervolg is op deze aanvragen? Zo ja, welke resultaten/inzichten hebben voorgaande studie gegeven?</li><li>- In de bijlage dierproeven onder B bij de diersoort is niet weergegeven waarom u voor de muis heeft gekozen als diersmodel. Kunt u onderbouwen waarom de door u gekozen soort het beste diersmodel is voor deze (en een eventuele vervolg-) studie?</li><li>- In de bijlage dierproeven onder F geeft u aan dat 'In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.'. Deze weergave komt niet overeen met de conclusie onderin het stuk bij F en de aangevraagde</li></ul>
---------------	---

	<p>aantallen onder B. Kunt u deze zin in overeenstemming brengen met de rest van de tekst?</p> <p>Over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- In de NTS spreekt u over de receptor AT1R en het eiwit sGC. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.</li> <li>- In de NTS geeft u onder de potentiële voordelen aan dat de nieuwe medicijnen in de nabije toekomst bij mensen getest gaan worden. Hierdoor wekt u de indruk dat het om translationeel onderzoek gaat. U geeft als projectdoel aan dat het om fundamenteel onderzoek gaat. Deze kant wordt nu onderbelicht. Kunt u dit toevoegen aan de NTS?</li> <li>- Bij de verwachte gevolgen/nadelige effecten in de NTS spreekt u van licht en matig ongerief. Kunt u aan het algemeen publiek uitleggen hoe bij uw proeven de dieren echter ernstig ongerief ervaren?</li> <li>- Algemene opmerking NTS: Kunt u deze nalezen op typ en interpunctie fouten?</li> </ul>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>				
	Muizen (Mus musculus)	C57BL6/J	1.038	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Males will be used instead of females since the female sex steroid hormone estradiol exerts neuroprotective effects on the development of ischemic lesion, which could influence the outcome of our experiment. After menopause, the risk for stroke and dementia increase in women due to the decrease in the neuroprotective effects of estrogens. This would require to perform ovariectomy in the female mice for healthy and diseased models, significantly increasing the number of animals, considering also the additional drop-out due to the surgery. This would make the procedures unrealistic considering the number of groups to be studied. It has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.</li><li>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</li></ul>
--	---

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat vraag 2 DEC: Ernstig ongerief wordt verwacht bij 27% van de dieren &lt;-&gt; bij fundamenteel onderzoek geeft dit problemen ten aanzien van de proportionaliteit van het ongerief voor de dieren ten opzichte van het belang van het onderzoek. Is deze aanvraag wel fundamenteel onderzoek en niet (ook) translationeel onderzoek?</p> <p>Citaat antwoord 2 aanvrager: Our animal research proposal is fundamental as we aim to assess the physiological (in healthy animals) and pathological relevance (in diseased animals) of signaling pathways for the regulation of cerebral blood flow. It does not include other functional readouts to translate our findings to the human condition (e.g. cognitive behavior). Due to the nature of the pathology studied (stroke and dementia), the discomfort experienced by some animals can indeed be considered as severe as described in the corresponding Table of the application file.</p> <p>Citaat vraag 39 DEC: Met de zinsnede 'The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.' lijkt uw onderzoeksaanvraag meer capaciteits- dan vraaggestuurd. Gezien het feit dat 27% van de dieren naar verwachting ernstig ongerief ondergaat worden de go/no go criteria en onderbouwing van de dieraantallen van</p>
-------------------	---

eminent belang. Naar de mening van de **5.1 lid2h** dienen deze beide aspecten te worden aangescherpt. Als go/no go criterium zou overwogen kunnen worden als uitgangspunt te nemen het effect van het meest veelbelovende farmacon per klasse in plaats van het streven naar het testen van alle beschikbare farmaca per klasse. Graag daarover uw mening.

Citaat antwoord 39 aanvrager: We understand the concern of the **5.1 lid2h** regarding the proportion of animals with severe discomfort. We would like to highlight that we have adapted the number of animals by refining our group size calculation and dropout rates in Sham mice (1038 mice instead of 1800 mice). In addition, we would like to also remind that the severe discomfort is purely related to the severity of the model (stroke) which is inherent to the project. Furthermore, we plan indeed to start our investigations with the most promising "lead" compounds per class based on previous and ongoing studies (in vitro and/or ex vivo) see previous answers. After analyzing the data obtained with one compound, we will summarize our findings and decide/or not/ to plan the study of another compound in that class in the working protocol that will be assessed by the animal welfare body. The decision to study a second and a third compound per class will not be based on the efficacy of the tested drug (yes/no as a go/no-go criteria) but rather on the information gained with the previous tested compound (e.g. choice of a compound that has a different pharmacokinetic profile or higher brain distribution). We think therefore that it is not possible to assign such go/no-go point as the decision will not be based on a binary criteria/parameter.

Citaat C18 (geslachten): De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken het noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager aangetoond dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een grotere variatie en dat dan er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1. Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de

aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?

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

- o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel
- o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.
- o Waarden die voor (toekomstige) patiënten bevorderd worden: substantieel voordeel.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van personen met cerebrovasculaire aandoeningen als herseninfarct en vasculaire dementie en hun naasten in het bijzonder, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, binnen het project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig tot ernstig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (o.a. bilaterale carotide arterie stenose (BCAS) of distale middelste cerebrale arterie occlusie (dMCAO), neurologische testen, vaatcannulatie, bloedflow metingen, toediening (orale gavage of via drinkwater) van farmaca, subcutane injecties, het aanbrengen van een osmotische minipomp, bloedafnames, en intraveneuze injecties) het leven met de gevolgen daarvan, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en aan het eind ervan worden opgeofferd.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot het verbeteren van de behandeling van vormen van herseninfarct (2e vaakst voorkomende doodsoorzaak in 2019) en vasculaire dementie (ca 16 miljoen mensen wereldwijd) waarbij de kwaliteit van leven voor de patiënten ernstig wordt aangetast en de prognose momenteel ongunstig is. Het gaat hier om grote groepen patiënten. Vanwege het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, zal het project echter niet op korte termijn bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten. Dit laatste is van vele factoren afhankelijk die in deze fase niet te over- en voorzien zijn.

Dit onderzoek biedt perspectief op meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven

verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de **5.1 lid2h** het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding en strikte toepassing van humane eindpunten, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag "Weegt in het onderzoek naar het verkrijgen van inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de doorbloeding van hersenen in een model voor herseninfarct of vasculaire dementie in het voorgestelde project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" de opoffering, het ongerief (73% matig, 27% ernstig) en de aantasting van integriteit dat de proefdieren daarin wordt aangedaan op tegen het belang van de uitkomsten voor (toekomstige) patiënten met cerebrovasculaire aandoeningen zoals vasculaire dementie en herseninfarct?" bevestigend.

De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening weegt het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de belangen van uiteindelijk patiënten die leiden aan cerebrovasculaire aandoeningen, naar haar mening zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.



Op grond van deze overwegingen beschouwt de meerderheid van de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" als ethisch gerechtvaardigd. Eén lid is echter van mening dat de validiteit van voorgesteld onderzoek in relatie tot het doel beperkt is en dat dit in combinatie met het ernstige ongerief en de fundamentele doelstelling van het onderzoek ervoor zorgt dat de proportionaliteit van voorgesteld onderzoek in het geding is. Op basis van de mening van de meerderheid voorziet de **5.1 lid2h** het projectvoorstel "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: Het uitgebrachte **5.1 lid2h** advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid is van mening dat het onderhavige onderzoeksvoorstel voorzien zou moeten worden van een negatief advies, omdat deze de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel trekt, de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide vindt, en het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk vindt.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat:

- 27% van de dieren zal ernstig ongerief ondervinden, wat een ethisch discussiepunt is binnen een fundamenteel onderzoeksproject.
- De translatie naar de menselijke context in relatie tot de constructvaliditeit van het model voor herseninfarct.
- Er worden slechts dieren van één sekse gebruikt, omdat er nooit is gewerkt met (ge-ovariotomeerde) vrouwelijke muizen bij het toepassen van BCAS en dMCAO. Daardoor zouden de modellen eerst gevalideerd moeten worden bij gebruik van vrouwelijke muizen, wat een studie en

	expertise op zich is, die de onderzoekers aangeven niet in huis te hebben.
--	--

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD wilt u bedanken voor de duidelijke weergave van het minderheidsstandpunt van het ene DEC lid. Ook de aangekaarte dilemma's heeft u duidelijk weergegeven.</p>	

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b>	<p>Citaat: The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke (post-acute phase) and vascular dementia.</p> <p>We will specifically assess the ability of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and in post-acute phase of ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions.</p> <p>Sub-objectives</p> <p>Aim 1: To study the impact of AT1R biased agonists on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) in healthy mice;</li> <li>b) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis) ;</li> </ul> <p>Aim 2: To study the impact of sGC stimulators/activators on CBF regulation:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) in healthy mice;</li> <li>c) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis).</li> </ul>
---------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Stroke</p> <p>Estimates from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD 2010) ranked stroke as the second most common cause of death(1) and the third most common cause of disability worldwide in 2010(2). In 2019, stroke was still the second cause of death worldwide according to the World Health Organization (WHO Health report 2019). The treatment of acute ischemic stroke has undergone dramatic changes recently subsequent to the demonstrated efficacy of endovascular thrombectomy(57). The selection of patients for this therapy is however based on timely CT or MR imaging and should be initiated within 6 hours of stroke onset. Alternatively intravenous thrombolysis with tissue-type plasminogen activator remains the standard acute stroke therapy within the initial 3-4.5 hours after stroke onset(58). Overall, the therapeutic time window and eligibility criteria for both approaches remain limited and new therapeutic options are urgently needed to restore CBF in the ischemic and at-risk areas. To circumvent this temporal challenge, clinicians are in urgent need of treatments for sub-acute (&gt;6h) and post-acute/chronic management of stroke patients.</p> <p>Dementia</p> <p>Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide, while nearly 10 million new cases are reported each year, with WHO estimations of 82 million cases in 2030 due to ageing(4). Out of all dementia cases, approximately 20% show VaD pathology(3). VaD causes the impairment of at least one cognitive domain that severely disrupts daily living. The treatment regime involves lifestyle interventions, control of vascular risk factors, and cognition enhancers that were originally developed for Alzheimer’s disease (AD)(59). Yet there is only limited evidence that any of these treatments prevent disease progression.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7: Voor zover de <b>5.1 lid2h</b> kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met farmacologische interventies, proefdiermodellen van cerebrovasculaire aandoeningen, wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V’s onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als Frontiers in Neuroscience, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism en Hypertension Research.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

### 3V's

Vervanging	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b></p> <p>Citaat: There is currently no alternative approach allowing the study of cerebral blood flow. There is also no alternative suitable to replace models of stroke and cerebral hypoperfusion.</p> <p>Replacement with human post-mortem material: human post-mortem samples are by definition late-stage pathological tissues that do not allow any functional and longitudinal studies</p> <p>Replacement with human participants: it is important (and mandatory) to perform pre-clinical investigations to assess the validity of the therapeutic approach. Clinical trials are also not suitable for mechanistic understanding of the pathology and treatment. For example, a phase 0 clinical study is aimed at verifying the safety and assessing some pharmacokinetic parameters of a drug but not to solve fundamental research questions. One low, subtherapeutic, dose can be tested in a phase 0 thus limiting the investigations for the study of the regulation of the CBF.</p> <p>Replacement with cells: beyond 2D cell work, 3D cell culture models that includes flow are not capable of reproducing the complexity of the cerebral cellular environment. Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies with capillaries (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents). We are already investigating the effect of some compounds on middle cerebral arteries mounted in arteriographs. This is useful to test several compounds at multiple doses, investigate some mechanisms but it concerns large vessels (&gt;100 µm) and it is not very informative for the study of microcirculation (~ 6-10 µm) as the expression of receptors, enzymes, ... differ a lot between vascular beds. Therefore our ex vivo investigations – although useful – can not replace the use of animals for the present project. There is also no model that allows the study of neurovascular coupling (i.e. the translation of neuronal activity into a vasodilatory reaction).</p>
------------	--

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b>  Citaat: The number of animals needed for this study has been calculated based on previous studies to ensure a proper statistical power is reached to assess differences in the primary readout parameters. Group size calculation will be performed prior to every working protocol as described in section A of the present appendix.</p>
Verfijnen	
	<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b>  Citaat: In addition to measures taken to minimize pain and discomfort, environmental enrichment and social housing will be done to improve animal's welfare. Furthermore the animal models have been chosen after careful consideration of alternative models and it has been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:  Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. J. Vis. Exp. 2014.  Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion Stroke 2004).</p>
<p><b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion:</b> De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>	HEP: 5% sham groep; 15% BCAS en dMCOA groep	Citaat: General considerations – humane endpoints for healthy mice groups: Humane endpoints will be considered if animals exhibit signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented by trained and experienced team members during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress reach humane endpoints, euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). A cumulative welfare score >6 or one criteria scored 3 will be considered a humane endpoint. Each criteria (awareness, posture, movement, social behavior, fascial expression, coat condition, nest building, breathing pattern) is scored from 0 to 3 (0=normal; 3= severely altered).Furthermore, a strong reduction in body weight will also be considered a humane endpoint according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/ or rehydration,

		<p>or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.</p> <p>Procedure/group-dependent considerations for the BCAS/Sham and dMCAO/Sham groups: After surgery, the Garcia neurological test will be used 2x/week to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>.</p> <p>The following criteria will be considered as humane endpoints: - a weight loss of &gt;20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>; - a Garcia score <math>\leq 10</math> (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will be considered a humane endpoint for the BCAS/Sham groups - a Garcia score <math>\leq 7</math> will be considered a humane endpoint for the dMCAO/Sham groups</p> <p>Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .</p>
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 28,0% Ernstig 72,0% Matig	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1



Er worden in het project alleen mannelijke dieren gebruikt. Volgens de DEC heeft de aanvrager voldoende onderbouwd waarom alleen mannelijke dieren

worden ingezet. 5.2 lid1

Het uitgebrachte advies van de DEC is een meerderheidsstandpunt. Een DEC-lid geeft een negatief advies. Dit DEC-lid trekt de validiteit van de gekozen diermodellen in twijfel, vindt de onderbouwing voor het gebruik van slechts één sekse niet valide, en vindt het fundamentele karakter van voorgesteld onderzoek, waardoor het project niet op korte termijn zal bijdragen aan effectievere behandeling van herseninfarcten, terwijl er sprake is van ernstig ongerief bij de dieren, bezwaarlijk.

De aanvrager geeft aan dat 28% van de dieren ernstig ongerief zullen ervaren. Volgens de DEC is het ongerief realistisch ingeschat. 5.2 lid1

Vanwege het cumulatief ernstige ongerief in het projectvoorstel, wordt een voorwaarde in de vorm van een beoordeling achteraf aan de vergunning verbonden.

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



Reaction CCD AVD<sup>5.1 lid2h</sup>202216338

V1 SF 5-10-22

### Niet technische samenvatting

- In de NTS spreekt u over de receptor AT1R en het eiwit sGC. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.

Non technical summary

- In the NTS you talk about the receptor AT1R and the protein sGC. This makes the NTS difficult for the general public to follow. We request that you replace technical language in the NTS with more accessible words.

We have replaced the sentence about AT1R and sGC targets by the following sentence in the section "Objectives of the project":

"Deze medicijnen werken elk op een specifiek onderdeel van een cel."

- In de NTS geeft u onder de potentiële voordelen aan dat de nieuwe medicijnen in de nabije toekomst bij mensen getest gaan worden. Hierdoor wekt u de indruk dat het om translationeel onderzoek gaat. U geeft als projectdoel aan dat het om fundamenteel onderzoek gaat. Deze kant wordt nu onderbelicht. Kunt u dit toevoegen aan de NTS?

- In the NTS you indicate under the potential benefits that the new drugs will be tested in humans in the near future. This gives the impression that it concerns translational research. You indicate as the project objective that it concerns fundamental research. This side is now underexposed. Can you add this to the NTS?

We have clarified in this statement that the present project is still fundamental (study to validate the relevance of some targets) before any translational study can be carried. See adjusted text below and in NTS section "potential benefits":

"De nieuwe medicijnen kunnen hersenbeschadiging door een beroerte of dementie mogelijk beperken of vertragen. Dit onderzoek zal uitwijzen of de gekozen nieuwe medicijnen relevant zijn voor deze ziekten. Als dat het geval is, vervolgstudies te worden uitgevoerd om de behandelingen te valideren. Tenslotte, dienen nieuwe medicijnen te worden vergeleken met de reguliere behandeling van een beroerte en vasculaire dementia om aan te tonen dat de nieuwe behandeling gelijkwaardig of beter is dan de reguliere behandeling."

- Bij de verwachte gevolgen/nadelige effecten in de NTS spreekt u van licht en matig ongerief. Kunt u aan het algemeen publiek uitleggen hoe bij uw proeven de dieren echter ernstig ongerief ervaren?

- You refer to the expected consequences/adverse effects in the NTS as mild and moderate discomfort. Can you explain to the general public how, however, the animals experience serious distress in your experiments?

Indeed, we have now added the following statement on severe discomfort in the NTS section "Expected impact...":

"Bovendien zal een deel van de dieren ook ernstig ongerief ervaren ten gevolge van het opwekken van een beroerte om de effecten van de te testen medicijnen te kunnen besturen."

- **Algemene opmerking NTS: Kunt u deze nalezen op typ en interpunctie fouten?**

- NTS general comment: Can you check this for typing and punctuation errors?

Thanks for the remark. The text has been checked and corrected by our Media & Communication Dept to remove any possible typing and punctuation errors.

### **Onduidelijkheden**

**- In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de groepsgrootte gebaseerd zijn op de studie AVD5.1 lid2h en AVD5.1 lid2h . Kunt u aangeven of deze studie een vervolg is op deze aanvragen? Zo ja, welke resultaten/inzichten hebben voorgaande studie gegeven?**

Uncertainties

- In the animal experiments appendix, you indicate that the group size is based on the studies AVD5.1 lid2h and AVD5.1 lid2h . Can you indicate whether this study is a follow-up to these applications? If so, what results/insights did the previous study provide?

No, the present study is not a follow-up of the studies that are mentioned. These past studies were used indeed for the group size calculation because they included the same readout (cerebral blood flow) but these studies addressed a research question that is not related to the current application.

**- In de bijlage dierproeven onder B bij de diersoort is niet weergegeven waarom u voor de muis heeft gekozen als diermodel. Kunt u onderbouwen waarom de door u gekozen soort het beste diermodel is voor deze (en een eventuele vervolg-) studie?**

- In the appendix animal experiments under B for the animal species it is not stated why you have chosen the mouse as the animal model. Can you substantiate why your chosen species is the best animal model for this (and any follow-up) study?

We have added the following sentence to justify the use of mice:

This project relies on the use of mice. So far, this is the only validated model in which cerebral blood flow can be imaged with a minimally invasive procedure (imaging through the skull) at a high-resolution using laser speckle contrast imaging technique. In addition, the study of ischemic stroke and cerebral hypoperfusion relies on standardized and robust surgical procedures that have been validated in mice (see model descriptions BCAS and dMCAO in paragraph A).

**- In de bijlage dierproeven onder F geeft u aan dat 'In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.'. Deze weergave komt niet overeen met de conclusie onderin het stuk bij F en de aangevraagde aantallen onder B. Kunt u deze zin in overeenstemming brengen met de rest van de tekst?**

- In the appendix animal experiments under F you indicate that 'In total, a maximum of 1320 mice will experience moderate discomfort (73% of all mice) and a maximum of 480 mice will experience severe discomfort (27% of all mice) as detailed in the following tables.'. This representation does not match the conclusion at the bottom of the piece at F and the requested numbers under B. Can you reconcile this sentence with the rest of the text?

This is indeed a mistake. We have changed the numbers before the tables to match the tables and summary at the end. We forgot to change numbers in that part.

"In total, a maximum of 750 mice will experience moderate discomfort (72% of all mice) and a maximum of 288 mice will experience severe discomfort (28% of all mice) as detailed in the following tables."



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

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

## 1

### Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in

5.1 lid2h

Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

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

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

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

Naam instelling of organisatie

5.1 lid2h

Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder

Titel Voorletters Achternaam

5.1 lid2e

Dhr.  Mw

E-mailadres contactpersoon

5.1 lid2e

Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)

Titel Voorletters Achternaam

Dhr.  Mw

E-mailadres gemachtigde

- Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer

Postcode en plaats

Postbus, postcode en plaats

5.1 lid2h

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters

5.1 lid2e

Dhr.  Mw.

Functie

5.1 lid2h

Afdeling

5.1 lid2h

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum   01-11-2022 Einddatum (t/m)   31-10-2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nieuwe medicijnen tegen beroerte en dementie
3.4		Naam DEC   5.1 lid2h Postadres

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

E-mailadres

5.1 lid2h

## 4 Factuurgegevens

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

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

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

Ordernummer:
--------------

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 1
---	---------------------------------

<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
--

Overige bijlagen, indien van toepassing

<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
---

<input type="checkbox"/>
--------------------------

## 6 Ondertekening

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

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

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

Naam

5.1 lid2e

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

17-08-2022

Handtekening



## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

#### Stroke and Vascular Dementia

Stroke is the second most common cause of death and the third most common cause of disability worldwide (1)(2). In addition, stroke is a major risk factor for cognitive impairment and dementia (3). Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide (4), of which 20% are due to vascular pathology, a.k.a.

vascular dementia (VaD) (3). VaD results from large vessel (stroke) or small vessel diseases (genetic or sporadic forms)(5). The pathological mechanisms of stroke and VaD are both linked to impairment of the cerebral blood flow (Figure 1).

### **Cerebral blood flow and neurovascular coupling**

The brain represents about 2% of the body weight and despite its relatively small size, it accounts for 20% of the oxygen and energy consumed by the body. (6). Since the brain is not designed to store energy, it relies on a dense vascular network to meet its high metabolic demand. The largest proportion of vessels in the brain are capillaries who represent a mesh with a total length of > 600 kilometers (7). This ensures an adequate supply of oxygen and nutrients to every brain cell. Beyond their high density, the cerebral capillaries are remarkable for their unique ability to tightly regulate the passage of blood-borne molecules to the brain. This so-called blood-brain barrier (BBB) protects the brain from harmful molecules and allows the entry of nutrients and immune modulating molecules and cells. Another specific feature of these cerebral small vessels is their highly dynamic propensity to regulate their diameter in order to adjust the blood flow to match the local energy demand. This phenomenon is described as neurovascular coupling (NVC), which relies on the activity of surrounding pericytes and astrocytes that translate neuronal activity into a vasodilatory message to increase the cerebral blood flow (CBF).

A decreased CBF is observed in both, stroke (penumbra area) and VaD (8–10). This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (e.g. catecholamines; angiotensin II) as well as from endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (11, 12)(20).

### **Molecular mechanisms associated with impaired blood flow**

#### 1) Exacerbation of Angiotensin II – AT<sub>1</sub>R signalling during stroke (Figure 1)

Angiotensin II (AngII) is a hormone that causes vasoconstriction and thereby increases the blood pressure. The contribution of AngII to the functional and structural remodelling of the cerebral vasculature is well known (13–16). AngII binds mainly to the Angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) to promote vasoconstriction (17, 18). AT<sub>1</sub>R is involved in vascular pathologies including ischemic stroke (19). During stroke, an increased production of Ang II is observed in the brain (20) leading to an increased AT<sub>1</sub>R-mediated vasoconstriction (21). This leads to a reduction in perfusion of brain tissue in the penumbra area, with subsequent expansion of the ischemic area and severity of the clinical consequences (19). This has led to the development of AT<sub>1</sub>R antagonists (or AngII Receptor blockers, ARBs, used since 30 years in clinical practice as anti-hypertensive drugs). ARBs have shown to be effective to increase CBF and protect from ischemic stroke in pre-clinical models (22–25). Numerous clinical trials have largely demonstrated the benefit of ARBs for stroke prevention (26, 27), but their contribution for the treatment of stroke remains debated (28, 29). While the Ang II – AT<sub>1</sub>R pathway is recognized as deleterious for CBF, its full blockade by AT<sub>1</sub>R antagonist may not be effective to maintain a physiological CBF.

#### 2) Impaired NO-sGC-cGMP signalling (Figure 1)

Nitric oxide (NO) is a key vasodilatory molecule that is produced by endothelial cells. NO stimulates the enzyme soluble guanylate cyclase (sGC) to produce the intracellular second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP)(30). The released cGMP can thereafter promote smooth muscle relaxation by activating the protein kinase G (PKG) that controls the myosin light chain phosphatase activity. The endothelial NO synthase (eNOS) and the sGC are found in vascular endothelial cells and their activity is decreased by hypertension following stroke, but also in brains of AD patients (31–33). Furthermore pathological processes in stroke and VaD, include increased oxidative stress and endothelial dysfunction, associated with decreased NO production, which in turn might lead to cognitive impairments (34–36). Recent research has shown that stimulating sGC with riociguat or vericiguat, both sGC stimulators which do not penetrate the BBB, are able to improve memory in rodents. This seems to be derived from an effect on the microvasculature, although this still has to be conclusively proven (PMID: 34440254; PMID: 35985509).

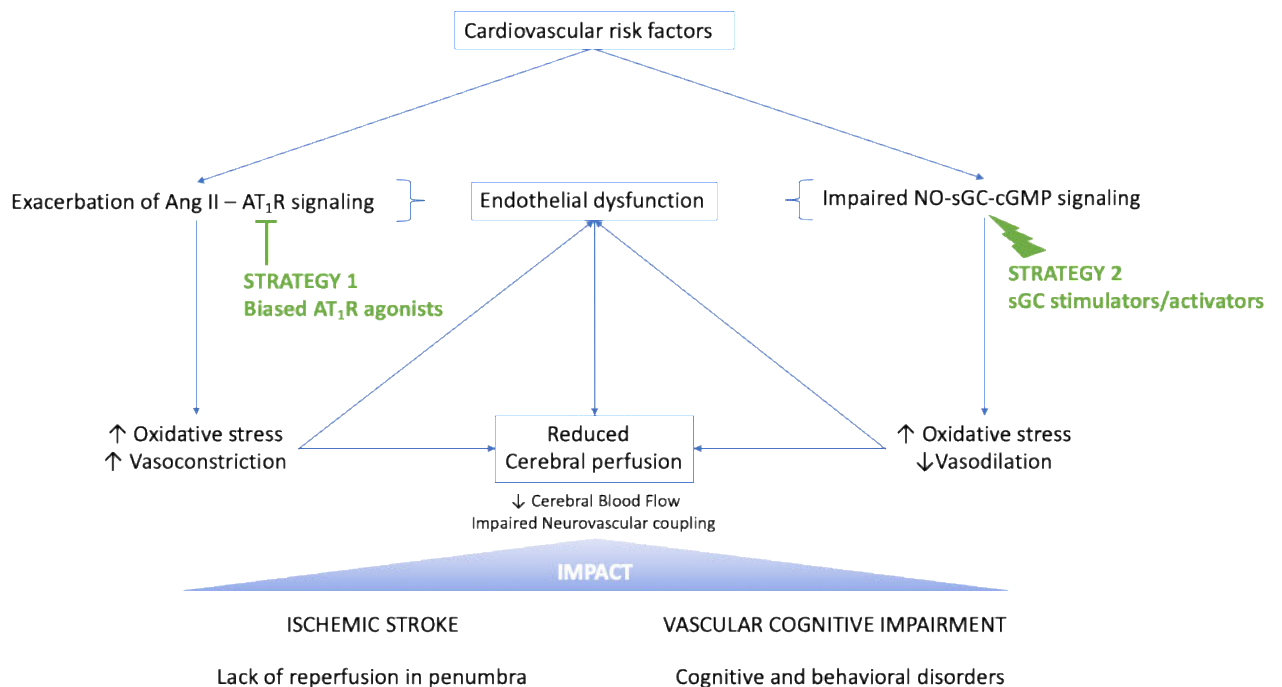
## Proposed pharmacological strategies to prevent or restore cerebral blood flow

### 1) AT<sub>1</sub>R biased agonists (Fig1)

Biased agonism is the ability of a ligand to selectively activate a part of the signalling cascade associated to a given receptor. AT<sub>1</sub>R biased agonists are thus capable of activating  $\beta$ -arrestin-mediated signalling without activation of the classical Gq pathway that would promote vasoconstriction. In addition to their role to promote receptor internalization, including AT<sub>1</sub>R (37),  $\beta$ -arrestins can also activate signaling pathways leading to vascular remodelling that may possibly improve perfusion (38–40). This selective agonism offers thus new therapeutic perspectives. AT<sub>1</sub>R biased agonists are capable of activating the  $\beta$ -arrestin pathway of the AT<sub>1</sub>R without switching the Gq/11 pathway on (e.g. TRV120027)(41). It has been shown to decrease the blood pressure and improve cardiac contractility in healthy condition (41). This beneficial cardiovascular effect was also demonstrated in a canine model of heart failure, in which systemic vascular resistance was decreased thereby decreasing the heart's pumping activity (42). These studies support the benefits of biased AT<sub>1</sub>R for cardiovascular pathologies, yet their impact on cerebral perfusion remains to be investigated.

### 2) sGC stimulators/activators (Fig 1)

sGC can be targeted by sGC stimulators and activators. sGC stimulators act on the NO-sensitive sGC (on the Fe(II)sGC), whereas activators specifically target the NO non-sensitive sGC (on the Fe(III)sGC and apo-sGC)(43). sGC stimulators and activators have been developed for cardiovascular therapy (44). These drugs are able to increase the enzymatic activity of sGC to generate cGMP independently of NO. This drug class is being tested for pulmonary hypertension and heart failure but investigations at the cerebrovascular level to preserve cerebral blood flow are lacking.



**Figure 1:** Schematic representation of the implication of the Angiotensin-II-AT<sub>1</sub>R and NO-sGC-cGMP pathways for brain perfusion. Both pathways are impacted by cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes) which can impair the cerebral perfusion. The proposed pharmacological strategies to counteract these pathological mechanisms are shown in green. Exacerbation of Angiotensin II – AT<sub>1</sub>R signalling and impairment of NO-sGC-cGMP signalling contribute to the reduction of cerebral perfusion, promoting the development of cerebral lesions and dysfunction in the context of ischemic stroke and vascular cognitive



impairment and dementia. We aim to assess the relevance of biased AT<sub>1</sub>R agonists (Strategy 1) and sGC activators/agonists (Strategy 2) to preserve cerebral blood flow and neurovascular coupling.

### 3.2 Purpose

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

- If applicable, describe all subobjectives

#### Ultimate goal

The ultimate aim of this study is to identify pharmacological strategies for the treatment of stroke (post-acute phase) and vascular dementia.

We will specifically assess the ability of AT<sub>1</sub>R biased agonists and sGC stimulators/activators to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and in post-acute phase of ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions.

#### Sub-objectives

Aim 1: To study the impact of AT<sub>1</sub>R biased agonists on CBF regulation:

- a) in healthy mice;
- b) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis);

Aim 2: To study the impact of sGC stimulators/activators on CBF regulation:

- a) in healthy mice;
- c) in disease models for ischemic stroke (Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion) and vascular dementia (bilateral carotid artery stenosis).

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The feasibility of the project is warranted by the scientific and technical skills present with the researchers of our team:

- pharmacology of the renin-angiotensin-system including AT<sub>1</sub>R (15, 16, 45–48)
- pharmacology of sGC-cGMP signalling (49–51)
- animal models of vascular cognitive impairment (52–54)
- CBF imaging in hypoperfused mice (Bilateral Carotid Artery Stenosis model) for the study of neurovascular coupling (PV2017-001)

The project's feasibility is further strengthened by the existence of previous pre-clinical and clinical studies who have successfully used the proposed pharmacological approaches for cardiovascular indications other than stroke, such as heart failure (41, 42, 55, 56) – this demonstrates the safety of the proposed pharmacological interventions. Identifying beneficial effects in pre-clinical models may pave the way for drug clinical trials for both stroke and vascular dementia indications.

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

No

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

### 3.3 Relevance

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

This project is of relevance for cerebrovascular diseases and especially for conditions like ischemic stroke and vascular- dementia.

##### Stroke

Estimates from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD 2010) ranked stroke as the second most common cause of death(1) and the third most common cause of disability worldwide in 2010(2). In 2019, stroke was still the second cause of death worldwide according to the World Health Organization (WHO Health report 2019). The treatment of acute ischemic stroke has undergone dramatic changes recently subsequent to the demonstrated efficacy of endovascular thrombectomy(57). The selection of patients for this therapy is however based on timely CT or MR imaging and should be initiated within 6 hours of stroke onset. Alternatively intravenous thrombolysis with tissue-type plasminogen activator remains the standard acute stroke therapy within the initial 3-4.5 hours after stroke onset(58). Overall, the therapeutic time window and eligibility criteria for both approaches remain limited and new therapeutic options are urgently needed to restore CBF in the ischemic and at-risk areas. To circumvent this temporal challenge, clinicians are in urgent need of treatments for sub-acute (>6h) and post-acute/chronic management of stroke patients.

##### Dementia

Approximately 50 million people suffer from dementia world-wide, while nearly 10 million new cases are reported each year, with WHO estimations of 82 million cases in 2030 due to ageing(4). Out of all dementia cases, approximately 20% show VaD pathology(3). VaD causes the impairment of at least one cognitive domain that severely disrupts daily living. The treatment regime involves lifestyle interventions, control of vascular risk factors, and cognition enhancers that were originally developed for Alzheimer's disease (AD)(59). Yet there is only limited evidence that any of these treatments prevent disease progression.

##### References

1. R. Lozano *et al.*, *Lancet*. **380**, 2095–2128 (2012).
2. *Alzheimer's & Dementia*. **16**, 391–460 (2020).
3. WHO | Dementia: a public health priority. *WHO*, (available at [http://www.who.int/mental\\_health/publications/dementia\\_report\\_2012/en/](http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/)).
4. Geneva: World Health Organization, *Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025* (WHO, 2017).
5. M. Dichgans, D. Leys, *Circ. Res.* **120**, 573–591 (2017).
6. M. E. Raichle, D. A. Gusnard, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**, 10237–10239 (2002).
7. D. J. Begley, M. W. Brightman, *Prog Drug Res.* **61**, 39–78 (2003).
8. S. M. Wong *et al.*, *Neurology*. **92**, e1669–e1677 (2019).
9. J. F. A. Jansen *et al.*, *Sci Rep*. **6**, 10 (2016).
10. L. Østergaard *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab.* **33**, 635–648 (2013).
11. M. G. Myers, J. W. Norris, V. C. Hachniski, M. J. Sole, *Stroke*. **12**, 200–204 (1981).
12. J. Schulze, A. Vogelgesang, A. Dressel, *Aging Dis.* **5**, 327–339 (2014).
13. F. Dupuis, J. Atkinson, P. Limiñana, J.-M. Chillon, *Br. J. Pharmacol.* **144**, 349–356 (2005).
14. F. Dupuis, J. Atkinson, P. Limiñana, J.-M. Chillon, *J. Hypertens.* **23**, 1061–1066 (2005).
15. S. Foulquier *et al.*, *PLoS ONE*. **7**, e42469 (2012).
16. S. Foulquier, I. Lartaud, F. Dupuis, *PLoS ONE*. **9**, e110766 (2014).
17. J.-M. Vincent *et al.*, *Stroke*. **36**, 2691–2695 (2005).
18. S. Foulquier, U. M. Steckelings, T. Unger, *Nature*. **493**, S9 (2013).
19. T. Walther *et al.*, *FASEB J.* **16**, 169–176 (2002).
20. J. Li *et al.*, *BMC Complement Altern Med.* **14**, 441 (2014).
21. E. Stenman, L. Edvinsson, *Stroke*. **35**, 970–974 (2004).
22. J. Zhou *et al.*, *Stroke*. **37**, 1271–1276 (2006).
23. Y. Nishimura, T. Ito, J. M. Saavedra, *Stroke*. **31**, 2478–2486 (2000).
24. W. Groth, A. Blume, P. Gohlke, T. Unger, J. Culman, *J. Hypertens.* **21**, 2175–2182 (2003).
25. T. Ito *et al.*, *Stroke*. **33**, 2297–2303 (2002).
26. B. Dahlöf *et al.*, *Lancet*. **359**, 995–1003 (2002).
27. H. Lithell *et al.*, *J Hypertens.* **21**, 875–886 (2003).
28. J. Schrader *et al.*, *Stroke*. **34**, 1699–1703 (2003).
29. E. C. Sandset *et al.*, *Lancet*. **377**, 741–750 (2011).
30. F. Z. Mónica, K. Bian, F. Murad, *Adv Pharmacol.* **77**, 1–27 (2016).
31. T. M. Paravicini, R. M. Touyz, *Cardiovasc Res.* **71**, 247–258 (2006).
32. F. Langhauser *et al.*, *NPJ Syst Biol Appl.* **4**, 8 (2018).
33. W. L. Bonkale, B. Winblad, R. Ravid, R. F. Cowbum, *Neurosci Lett.* **187**, 5–8 (1995).
34. T. M. De Silva, F. M. Faraci, *Cell Mol Neurobiol.* **36**, 241–258 (2016).
35. S. Chrissobolis, A. A. Miller, G. R. Drummond, B. K. Kemp-Harper, C. G. Sobey, *Front. Biosci.* **16**, 1733–1745 (2011).

36. E. Cuadrado-Godia *et al.*, *J Stroke*. **20**, 302–320 (2018).
37. L. Hunyady, K. J. Catt, A. J. Clark, Z. Gáborik, *Regul Pept*. **91**, 29–44 (2000).
38. R. T. Kendall *et al.*, *J Biol Chem*. **289**, 26155–26166 (2014).
39. L. M. Luttrell *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 2449–2454 (2001).
40. Y. Taniyama *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol*. **287**, C494–499 (2004).
41. G. Boerrigter *et al.*, *Circ Heart Fail*. **4**, 770–778 (2011).
42. G. Boerrigter, D. G. Soergel, J. D. Violin, M. W. Lark, J. C. Burnett, *Circ Heart Fail*. **5**, 627–634 (2012).
43. P. Sandner *et al.*, *Handb Exp Pharmacol*. **264**, 355–394 (2021).
44. S. Breitenstein, L. Roessig, P. Sandner, K. S. Lewis, *Handb Exp Pharmacol*. **243**, 225–247 (2017).
45. C. Delaitre, M. Boisbrun, S. Lecat, F. Dupuis, *Int J Mol Sci*. **22**, 6738 (2021).
46. M.-L. Bouressam *et al.*, *Br J Pharmacol*. **176**, 2049–2062 (2019).
47. M. Meyer *et al.*, *Eur J Med Chem*. **158**, 334–352 (2018).
48. S. Foulquier *et al.*, *J Hypertens*. **29**, 1392–1399 (2011).
49. L. G. J. M. Borghans, A. Sambeth, J. Prickaerts, J. G. Ramaekers, A. Blokland, *Psychopharmacology (Berl)*. **235**, 2407–2416 (2018).
50. E. Nelissen *et al.*, *Biomedicines*. **9**, 1047 (2021).
51. J. Prickaerts, J. de Vente, W. Honig, H. W. M. Steinbusch, A. Blokland, *Eur. J. Pharmacol*. **436**, 83–87 (2002).
52. S. Foulquier *et al.*, *Hypertens. Res*. **41**, 817–827 (2018).
53. D. Kerkhofs *et al.*, *Theranostics*. **10**, 9512–9527 (2020).
54. T. Koizumi *et al.*, *J Neuroinflammation*. **16**, 79 (2019).
55. G. M. Felker *et al.*, *JACC Heart Fail*. **3**, 193–201 (2015).
56. P. W. Armstrong *et al.*, *N Engl J Med*. **382**, 1883–1893 (2020).
57. O. A. Berkhemer *et al.*, *N. Engl. J. Med*. **372**, 11–20 (2015).
58. L. Catanese, J. Tarsia, M. Fisher, *Circ Res*. **120**, 541–558 (2017).
59. O. A. Skrobot *et al.*, *Alzheimers Dement*. **14**, 280–292 (2018).

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

#### Academic sector

We aim to unravel mechanisms of relevance to protect from cerebrovascular diseases by targeting two different signalling pathways. This project will bring new insights on the studied pharmacological targets.

#### Pharmaceutical industry

Our pre-clinical investigations will be useful for R&D sectors of pharmaceutical companies. By validating the relevance of the studied targets, it may attract companies to screen their small molecule libraries to identify and screen new drug candidates with increased selectivity and efficacy.

#### Society /Patients

This study is intended to test drugs that may prevent cognitive impairment after stroke or VaD. Taking into consideration the major burden caused by stroke and dementia on our societies (see 3.1 Background section), we consider this largely outweighs the moderate to severe discomfort experienced by the animals, their violation of integrity and the termination of their life, as detailed in our proposal. Stroke is the second most common cause of death and the third most common cause of disability worldwide and a major risk factor for cognitive impairment and dementia. In addition, ~10 million people suffer from dementia worldwide: beyond the patients themselves, this also negatively impacts their families, our healthcare systems and the worldwide economy. Furthermore, this impact is expected to increase with the ageing of the population. Our study will bring new insights into the function and relevance of signalling pathways for the regulation of cerebral blood flow in stroke and dementia. This fundamental research is a first step towards the testing of corresponding drugs in stroke and/or vascular dementia patients.

#### Animals

To limit the impact on animals, the most relevant models with the least discomfort have been selected for the study of ischemic stroke and vascular dementia. Furthermore, all procedures will be approved by the animal welfare committee to guarantee a minimal discomfort and ensure the group size is adequate to assess relevant differences on the main readout parameters.

### 3.4 Strategy

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

We will study the effect of acute and chronic impact of the proposed treatment.

Acute treatment: It is important to assess the acute effect of the drug on cerebral blood flow to know if we can expect a beneficial effect in the acute treatment phase of stroke, due to immediate vaso-active effects.

Chronic treatment: It is important to assess the chronic effect of the drug on cerebral blood flow to study possible beneficial effect in a chronic condition like VaD possibly mediated by cellular effects such as angiogenesis, in addition to the vaso-protection.

The time windows for acute and chronic treatments are specified in 3.4.2 under the description of the animal models.

#### Acute treatments (Figure 2)

A maximum of 3 compounds will be administered acutely (i.v.) in healthy and diseased mouse models per drug class (i.e., biased AT<sub>1</sub>R agonist and sGC stimulator/activator). The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.

- In healthy mice, the aim is to assess their acute impact on resting physiological CBF;
- In diseased models (1 ischemic stroke model = distal middle cerebral artery occlusion and 1 cerebral hypoperfusion model to mimic VaD = bilateral carotid artery stenosis), the aim is to assess their ability to restore impaired CBF.

The presence of an effect in healthy mice is not a pre-requisite for the study of the corresponding compound in diseased models. Indeed, a compound might not increase the cerebral blood flow in mice with a physiological values while it might however still prove to be beneficial in diseased models where the flow is reduced.

In addition, the compounds may be studied in both diseased models: the presence of an effect in one diseased model is not a pre-requisite for its study in the second diseased model. Since the pathophysiological mechanisms differ in both diseased models, one compound may be effective in restoring CBF in one condition only.

N.B.: the study of AT<sub>1</sub>R biased agonists will require the administration of the natural ligand Angiotensin II to observe the counteracting AT<sub>1</sub>R effects of the tested compound. This will be done in healthy and diseased animals as the expression of AT<sub>1</sub>R will differ with the condition. The procedure will be detailed in the corresponding working protocol. In short, Ang II will be administered before and after the acute administration of the biased agonist. We expect to observe an acute decrease in CBF after AngII injection subsequent to the AT<sub>1</sub>R-mediated vasoconstriction (e.g. mimicking the AngII release during stroke) and we expect to observe an attenuation of this CBF decrease upon treatment with an AT<sub>1</sub>R biased agonist due to the beta-arrestin mediated internalization of the AT<sub>1</sub>R.

#### Chronic treatments (Figure 2)

A maximum of 3 compounds per drug class will be tested in chronic conditions in healthy and diseased mouse models. The duration of the administration will be adapted to each animal model to match the time course of the CBF reduction: 1 week maximum for the ischemic stroke model and 3 weeks maximum for the cerebral hypoperfusion model.

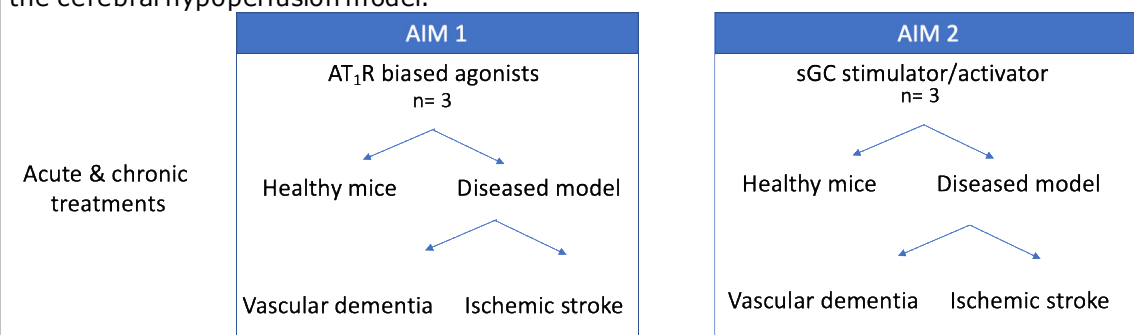


Figure 2: Schematic overview of the study design for both Aim 1 and Aim 2.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The strategy has been chosen to characterize the acute and chronic effects of the compounds on the CBF in health and disease. To assess the differential impact of the studied signalling pathways on physiological and pathological CBF, the tested drugs will be studied in healthy and diseased animal models that exhibit an impaired CBF. This will be achieved in the Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) model to induce ischemic stroke and in the Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS) model to mimic VaD (see Appendix 1). These 2 models have been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:

Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO): this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS): this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

dMCAO model:

acute timepoint: max 3 days after the induction of stroke;

chronic timepoint: max 7 days after stroke.

BCAS model:

acute timepoint: max 7 days after the induction of cerebral hypoperfusion;

chronic timepoint: max 3 weeks after the induction of cerebral hypoperfusion.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion
2	
3	
4	



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1 Provide the  
· approval number  
1 of the  
'Netherlands Food  
and Consumer

5.1 lid2h

1 Provide the name  
· of the licenced

5.1 lid2h

1 List the serial  
· number and type  
3 of animal  
procedure

Serial	Type of animal
1	Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

### Ultimate goal

To assess the ability of AT<sub>1</sub>R biased agonists (Aim 1) and sGC stimulators/activators (Aim 2) to improve CBF in conditions of cerebral hypoperfusion and ischemic stroke. The pharmacological interventions will be tested in healthy and diseased animals to assess their impact on CBF and blood pressure in physiological and pathological conditions (Figure 1). The number of compounds to be tested is based on the number of available compounds per class and the technical feasibility in the time period of this animal project.

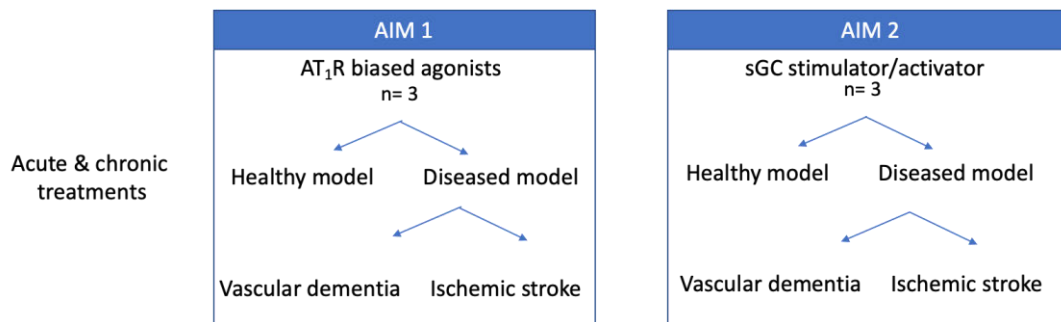


Figure 1: Overview of the experimental design

### Disease models:

**Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion:** this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. (Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.)

**Bilateral Carotid Artery Stenosis:** this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

**Primary outcome parameter for both Aims 1 and 2:** relative cerebral blood flow changes (CBF in %) vs baseline or control and cerebral blood flow change mediated by neurovascular coupling (in %).

The CBF will be measured by Laser Speckle Contrast Imaging. In brief, this imager measures the blurring effect of a speckle pattern created by the interference of the moving red blood cells within the blood vessels with the coherent light emitted by the device (near-infrared laser light).

**Justification:** A decreased CBF is observed in both, stroke and VaD. This results from an exaggerated vasoconstriction due to the release of potent constricting hormones (focus of Aim 1) as well as from an endothelial dysfunction with subsequent impaired vasodilatory capacity (focus of Aim 2). We want therefore to assess the efficacy of modulating the signalling pathways to improve CBF and CBF reactivity in healthy and disease condition.

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

Overview of the proposed animal procedures:

N.B.: not all procedures will be performed in all animals. The different animal studies and the associated estimated cumulative discomforts are listed in the Table section B.

Procedures	Nature	Duration & Frequency
Body weight measurement	Non-invasive, awake animals	Max. 1x/day (max 1 min)
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)	Invasive, anaesthetized animals	1x (max 2h)
Garcia neurological test	Non-invasive, awake animals	Max. 1x/day (max 2 min)
Distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO)	Invasive, anaesthetized animals	1x (max 2h)
Vessel cannulation	Invasive, anaesthetized animals	Max 1x (max 1h)
CBF measurement and neurovascular coupling	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 2x (max 2h)
Treatment in drinking water or gavage*	Non-invasive, awake animals	Max 1x/day (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)
Treatment via SC injection*	Minimally invasive, awake animals	Max 1x/day (acute study: max 7 days; not for chronic study)
Treatment via osmotic minipump	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 1x implantation (duration max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)
Blood collection** Via vena saphena Max 100 µl/week	Minimally invasive, awake, restrained animals	1x/week (duration max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study) (max 2 min per collection)
I.V. injection of tracers	Minimally invasive, anaesthetized animals	Max 1x (1 min)
Terminal anesthesia and perfusion	Invasive, anaesthetized animals	Max 1x (max 30 min)

\*: The administered volumes and frequency of the administration procedures (oral gavage and injections) will follow NC3R guidelines (<https://researchanimaltraining.com/article-categories/procedures-with-care/>)

\*\* : Maximum blood volume and frequency of blood collection will follow NC3R guidelines (<https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse> )

Description and justification of the proposed animal procedures:



Body weight measurement: Regular body weight measurement to monitor the animal welfare;

Animal welfare scoring or neurological scoring to assess animal discomfort and humane endpoints

Blood collection: venous blood collection (vena saphena) to assess systemic parameters involved the disease progression (e.g. inflammatory cytokines) and the impact of drug treatments (mild discomfort). Maximum blood volume and intervals for blood collection will follow NC3R guidelines (<https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse>) :

- 1x/week; maximum once for acute study; maximum 3 times for chronic study;
- Maximum volume per week per collection: 100 µL via the vena saphena

Vessel cannulation under anesthesia (terminal procedure):

- cannulation of the femoral artery to allow acute blood pressure measurement during the CBF imaging which is of importance to assess the acute drug effects on the blood pressure regulation and its possible impact on CBF regulation;

A possible impact of the tested compounds on blood pressure is of major importance for:

- Knowing if the compounds might impact the blood pressure and thus be a positive or negative side effect of the therapeutic strategy;
  - Knowing if the CBF measurement is performed within the normal (physiological) blood pressure range;
  - Knowing if the change in CBF observed upon the administration of the tested compound is independent of any blood pressure changes. Indeed, the cerebral circulation benefits from the autoregulation principle. It adapts to maintain CBF constant over a certain range of blood pressure values i.e. CBF should not be altered when blood pressure is decreased or increased until certain physiological limits. However, upon drastic increases and decreases of the blood pressure (e.g. hypertensive crisis; hemorrhage), the CBF will follow the blood pressure passively.
- cannulation of the carotid artery to allow injection of compounds and the study their acute effects on the CBF
  - cannulation of the jugular vein to allow perfusion of anaesthetics.

CBF measurement and neurovascular coupling: the cortical CBF will be assessed in anaesthetized animals using a laser doppler or speckle contrast imaging technique. This will require a minimally-invasive surgical procedure to image the CBF transcranially. In short, the skin over the skull is retracted with a colibri retractor to allow the visualization of the skull. The Laser Speckle Contrast Imager is then positioned above the skull to image CBF through the skull. CBF measurement will be performed under conditions to test the cerebrovascular reactivity such as neurovascular coupling (e.g. whisker stimulation; injection of drugs). Neurovascular coupling corresponds to the transient change in CBF due to neuronal activity. The study of neurovascular coupling allows to test the normal reactivity of cerebral vessels without the need to inject vasoreactive compounds. In animal studies with mice and rats, neurovascular coupling is studied via the mechanical stimulation (movement) of whiskers upon a certain frequency (5-10Hz) for a short period (usually 20-30 seconds) in lightly sedated animals. The detailed procedure will be submitted at the stage of the working protocol. This is a procedure we have already performed in several mouse and rat studies successfully. (mild discomfort).

CBF is measured during a first imaging session: before and after the surgical interventions to assess the CBF impairment induced in the model at the start of the animal study. In addition CBF is also imaged at the end of the animal study (second imaging session; terminal procedure) to assess the impact of the treatment on CBF and neurovascular coupling. The number of imaging sessions is limited to 2 for the disease models as indicated in the table with the procedures (section A). For the "acute study: with healthy mice groups however, only one terminal imaging session is needed.

Drug treatments: the most suitable route will be preferred.

In healthy animals, consecutive increasing doses will be administered i.v. to investigate the direct effects of the tested compounds on CBF in physiological conditions (dose-response curve); In diseased animal models, a single treatment dose will be selected per compound for the disease animal models based on previous studies (published and unpublished work).

i.v. injection of tracers: injection of vascular tracers to assess the blood brain barrier permeability by immunohistochemistry

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS): this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. Upon exposure of the carotid arteries, microcoils (0,18 mm internal diameters) will be placed around both common carotid arteries to reduce their diameters (30 min delay between both carotids). The CBF is measured before and after placing the microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm. The animals will be studied for a maximum period of 3 weeks as this is the maximal period with constant CBF reduction and period when structural brain lesions and cognitive decline develop. We will therefore study the impact of acute treatment (1 week, with established CBF reduction but no major lesion) and chronic treatment (3 weeks, CBF reduction with structural lesions). (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion *Stroke* 2004).

Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion (dMCAO): mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation. In short, a skin incision is made between the ear and eye and the temporal muscle is detached from the skull (muscle flap) to allow the visualization of the MCA branches through the skull. The MCA and its branches are coagulated using electrocoagulation forceps. The resulting infarct is cortical and the relative infarct volume corresponds to the majority of human strokes. The animals will be studied for a maximum period of 1 week as the functional impact in the model is maximal in the first week and possible vascular collateralization can occur after 1 week. This also corresponds to the desired treatment window in stroke patients (first days after stroke). We will therefore study the impact of acute treatment (max 3 days, period in which the ischemic area is expanding and reach its maximum volume) and chronic treatment (1 week, maximum ischemic area). (Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. *J. Vis. Exp.* 2014.)

Terminal anesthesia and perfusion: perfusion protocols will be chosen based on the planned investigations ex vivo (molecular vs IHC) (mild discomfort).

---

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

---

Power calculations will be made using G\*Power considering the use of One-way ANOVA to assess the impact of studied drug on the CBF in healthy mice (dose effect) or its impact in diseased mice (3 groups: Disease treated Disease non-treated, vs non-disease). Group size calculations will be based on previous own studies to take into account the variability of the main readout parameters. The calculations will be detailed in each working protocol. At this stage, the group size is estimated as indicated below:

group size calculation using G\*Power v3.1.9.6.

F-test (One-way ANOVA fixed effects, a priori group size calculation),

3 groups (e.g. Sham, dMCAO untreated, dMCAO treated),

$\alpha = 0,05$ ;  $\beta = 0,20$ , power = 0,80

Latest CBF reactivity value from control group (WP 2018-016-009 - AVD5.1 lid2h )

$m=15,59\%$   $SD=3,2\%$ ,  $cv=20,5\%$

Desired effect size = 13%, thus effect size  $f = 0,796$ ;

Total sample size (for 3 groups) = 30, So  $n=10/group$ .

Based on a previous study (WP2017-001-005; AVD5.1 lid2h ), the dropout rate is estimated 10% in Sham (and healthy control) groups (5% dropout for unexpected reason + 5% for surgical complications or reaching humane endpoints), while it is 20% for the diseased models (BCAS, dMCAO) (5% dropout for unexpected reason + 15% for surgical complications or reaching humane endpoints)

Therefore the final group size calculation is:

Sham, Control  $\rightarrow n(\text{final}) = 10 * 1,10 = 11$  mice/group

BCAS, dMCAO  $\rightarrow n(\text{final}) = 10 * 1,20 = 12$  mice/group

The group size calculation will be performed for every new animal study (for every working protocol to take into account the latest statistical data (e.g. dropout rate)).

## B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
-	Mus musculus	Licensed vendors	Adult	1038	Male	No	C57 BL6 /J

Provide justifications for these choices

This project relies on the use of mice. So far, this is the only validated model in which cerebral blood flow can be imaged with a minimally invasive procedure (imaging through the skull) at a high-resolution using laser speckle contrast imaging technique. In addition, the study of ischemic stroke and cerebral hypoperfusion relies on standardized and robust surgical procedures that have been validated in mice (see model descriptions BCAS and dMCAO in paragraph A).

Species	Mus musculus
Origin	Licensed vendors
Life stages	Adult: For Healthy groups: 8-10 weeks-old For BCAS/Sham : 8-10 weeks-old For dMCAO/Sham : 10 weeks-old

Number

table	Group number	Acute	Chronic	Healthy	Disease - BCAS	Disease - MCAO	Total
1	1.1			3 compounds x 11 mice			33
	1.2 1.3 1.4				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated +11 Sham)		105
	1.5 1.6 1.7					3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
	1.8 1.9			3 compounds x 11 mice x 2 groups (treated/non-treated)			66
	1.1 0 1.1 1 1.1 2				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated +11 Sham)		105
	1.1 3 1.1 4 1.1 5					3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
	<b>Maximum total Aim 1</b>						
2	2.1			3 compounds x 11 mice			33
	2.2 2.3 2.4				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated +11 Sham)		105

2.5 2.6 2.7					3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
2.8 2.9			3 compounds x 11 mice x 2 groups (treated/non- treated)			66
2.1 0 2.1 1 2.1 2				3 compounds x (12 BCAS + 12 BCAS treated +11 Sham)		105
2.1 3 2.1 4 2.1 5					3 compounds x (12 MCAO+ 12 MCAO treated + 11 Sham)	105
<b>Maximum total Aim 2</b>						<b>519</b>
<b>Maximum total study</b>						<b>1038</b>

Sham animals will be required for all diseased groups to assess if the treatment is able to restore CBF to normal values.

We will study the effect of acute and chronic impact of the proposed treatment. Acute treatment: It is important to assess the acute effect of the drug on cerebral blood flow to know if we can expect a beneficial effect in the acute treatment phase of stroke, due to immediate vaso-active effects.

Chronic treatment: It is important to assess the chronic effect of the drug on cerebral blood flow to study possible beneficial effect in a chronic condition like VaD possibly mediated by cellular effects such as angiogenesis, in addition to the vaso-protection.

The investigations in healthy mice are also split into acute and chronic studies. In the acute study, we aim to study the direct effect of compounds on CBF i.e. the tested drug will be injected i.v. during the imaging session, allowing us to do a dose-response curve experiment (see list of procedures). In the chronic study on the other hand, we aim to assess the long-term effect of the treatment on CBF in physiological conditions and assess the CBF before/after this period, therefore requiring a control, untreated group.

The presence of an effect in healthy mice is not a pre-requisite for the study of the corresponding compound in diseased models. Indeed, a compound might not increase the cerebral blood flow in mice with a physiological values while it might however still prove to be beneficial in diseased models where the flow is reduced.

In addition, the compounds may be studied in both diseased models: the presence of an effect in one diseased model is not a pre-requisite for its study in the second diseased model. Since

	the pathophysiological mechanisms differ in both diseased models, one compound may be effective in restoring CBF in one condition only.
Gender	<p>Males will be used instead of females since the female sex steroid hormone estradiol exerts neuroprotective effects on the development of ischemic lesion, which could influence the outcome of our experiment. After menopause, the risk for stroke and dementia increase in women due to the decrease in the neuroprotective effects of estrogens. This would require to perform ovariectomy in the female mice for healthy and diseased models, significantly increasing the number of animals, considering also the additional drop-out due to the surgery. This would make the procedures unrealistic considering the number of groups to be studied. It has been therefore decided to investigate the treatments in male mice and to postpone the validation in ovariectomized or post-menopausal mice for a later study after selecting the most efficient treatment in the present study.</p> <p>Koellhoffer EC, McCullough LD. The effects of estrogen in ischemic stroke. <i>Transl Stroke Res.</i> 2013 Aug;4(4):390-401. doi: 10.1007/s12975-012-0230-5.</p> <p>Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. <i>J Cereb Blood Flow Metab.</i> 2000 Apr;20(4):631-52. doi: 10.1097/00004647-200004000-00001.</p>
Genetic alterations	No
Strain	C57BL6/J

### C. Accommodation and care

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

Yes

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

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

The surgical procedures will be performed under general anaesthesia. The depth of anaesthesia will be monitored regularly by checking the presence of reflexes. Prior, during and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent and relieve the pain associated with the surgery.

Welfare score sheets will be filled in for each animal and will be used throughout the entire duration of the study to ensure that the discomfort of the animals – due to the surgical procedures and the disease - do not exceed the humane endpoints defined for the study.

In summary, the probability of suffering will be minimized by a combination of anaesthesia, pain control, optimal housing as well as regular inspection of animal welfare.

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

1) As a result of the BCAS and dMCAO surgeries, animals will exhibit an impaired behavior (expected);

After BCAS surgery, possible neurological complications may appear such as an impaired locomotor function and behavior (hypo- or hyper-activity); an abnormal posture; a poor coat condition.

After dMCAO surgery, the animals will show ischemic stroke related symptoms, varying from healthy, mild unilateral paralysis, non-severe unilateral paralysis with curving of the back to severe unilateral or bilateral paralysis with pronounced curving of the back

2) A risk for possible complications after surgery;

3) Although no major complications were observed in previous studies, there is always a risk for possible complications due to drug treatment due to an unknown/non-reported toxicity.

Explain why these effects may emerge.

1) This effect is expected for the model studied

In BCAS: these effects are expected due to the reduced cerebral perfusion;

In dMCAO: these effects are expected due to the induction of an ischemic stroke;

2) This effect might occur following the surgical interventions;

3) it is not possible to predict the absence of toxicity in the model studied.

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

1) To minimize discomfort post-surgery, dietgels and wet food will be made accessible to promote food and water intake. Additionally pain killer drugs will be administered in the days following the surgery. If the severity of pathology leads to the humane endpoint described below, the animal will be euthanized to avoid unnecessary pain or distress;

2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, loose suture, poor wound healing, edema formation,...) and a solution will be implemented to avoid future complications.

3) If the toxicity observed leads to a discomfort exceeding the moderate discomfort expected for the study and/or if it impairs the interpretation of the data, the treatment will be interrupted and animals will be euthanized if humane endpoints are reached.

### **E. Humane endpoints**

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

No > Continue with question F

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

General considerations – humane endpoints for healthy mice groups:

Humane endpoints will be considered if animals exhibit signs of distress including reduced activity, general malaise, poorly groomed skin, arched back. The quality of the signs of distress will be documented by trained and experienced team members during critical timepoints of the study (e.g. after surgery). If the symptoms of distress are still considered treatable, animals will be treated with analgesics (mostly Buprenorphine) to reduce signs of pain or additional fluid (saline or sugar) infusions in case of dehydration. However, when the symptom(s) of distress reach humane endpoints, euthanasia will be performed. We score the severity of distress/discomfort for a specific symptom in a range between 0-3 (0 is normal). A cumulative welfare score >6 or one criteria scored 3 will be considered a humane endpoint. Each criteria (awareness, posture, movement, social behavior, facial expression, coat condition, nest building, breathing pattern) is scored from 0 to 3 (0=normal; 3= severely altered). Furthermore, a strong reduction in body weight will also be considered a humane endpoint according to the Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report: if animal's bodyweight loss exceeds 20% pre-surgical weight, despite additional feeding and/or rehydration, or if they remain immobile for over 24 h (Smith et al, Laboratory animals 2018 DOI: 10.1177/0023677217744587). In case of doubt whether or not to treat and whether or not to euthanize, the veterinarian (art. 14) will be consulted.

Procedure/group-dependent considerations for the BCAS/Sham and dMCAO/Sham groups:

After surgery, the Garcia neurological test will be used 2x/week to assess eventual motor and behavioral deficits indicative of major neurological damage. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum<sup>22</sup>.

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described<sup>7</sup>;
- a Garcia score  $\leq$  10 (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will be considered a humane endpoint for the BCAS/Sham groups
- a Garcia score  $\leq$  7 will be considered a humane endpoint for the dMCAO/Sham groups

Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized by cervical dislocation to avoid any unnecessary stress and pain .

---

Indicate the likely incidence.

The expected incidence is low for Sham groups (5%) and moderate for BCAS and dMCAO groups (15%).

---

#### **F. Classification of severity of procedures**

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

---



In total, a maximum of 750 mice will experience moderate discomfort (72% of all mice) and a maximum of 288 mice will experience severe discomfort (28% of all mice) as detailed in the following tables.

An overview of the estimated discomfort per procedure and animal series and groups is given below. For clarity, the descriptions of the procedures and their corresponding discomfort have been split into 3 tables for every model (Table 1, healthy mice; Table 2, Sham and dMACO mice; Table 3, Sham and BCAS mice).

**Table 1: Procedures and corresponding discomfort for the healthy mice groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B: 1.1, 1.8, 1.9, 2.1, 2.8, 2.9

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = non-recovery procedure (1 day);

Chronic timepoint = 3 weeks

Procedures	Estimated discomfort	AIM 1 Acute	AIM1 Chronic	AIM 2 Acute	AIM 2 Chronic	Total
Body weight measurement	mild	33	66	33	66	198
Animal welfare scoring	mild	33	66	33	66	198
Blood collection	moderate	33	66	33	66	198
Vessel cannulation	moderate	33	66	33	66	198
CBF measurement and neurovascular coupling	moderate	33	66	33	66	198
Treatment in drinking water or gavage	Mild/moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	33	66	33	66	198
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 7 days; not for chronic study)	33	0	33	0	66
Treatment via osmotic minipump	Moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	33	66	33	66	198
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	33	66	33	66	198
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	33	66	33	66	198
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (66)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (66)</b>	<b>Moderate (198)</b>

**Table 2: Procedures and corresponding discomfort for the Sham/dMCAO mouse groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B:

1.5, 1.6, 1.7, 1.13, 1.14, 1.15, 2.5, 2.6, 2.7, 2.13, 2.14, 2.15

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = 3 days; Chronic timepoint = 7 days

<b>Procedures</b>	<b>Estimated discomfort</b>	<b>AIM 1 Acute</b>	<b>AIM1 Chronic</b>	<b>AIM 2 Acute</b>	<b>AIM 2 Chronic</b>	<b>Total</b>
Body weight measurement	mild	105	105	105	105	420
Neurological scoring	mild	105	105	105	105	420
Blood collection	moderate	105	105	105	105	420
Sham surgery for dMCAO	moderate	33	33	33	33	132
dMCAO surgery	severe	72	72	72	72	288
Vessel cannulation	moderate	105	105	105	105	420
CBF measurement and neurovascular coupling	moderate	105	105	105	105	420
Treatment in drinking water or gavage	Mild/moderate (max 3 days for acute study; max 7 days for chronic study)	105	105	105	105	420
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 3 days; max 7 days for chronic study)	105	105	105	105	420
Treatment via osmotic minipump	Moderate (not for acute study; max 7 days for chronic study)	0	105	0	105	210
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	105	105	105	105	420
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	105	105	105	105	420
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (33)</b>	<b>Moderate (132)</b>

		<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (72)</b>	<b>Severe (288)</b>

**Table 3: Procedures and corresponding discomfort for the Sham/BCAS mouse groups**

Corresponding group numbers as listed in Table section B:

1.2, 1.3, 1.4, 1.10, 1.11, 1.12, 2.2, 2.3, 2.4, 2.10, 2.11, 2.12,

Total time for the animals in the experiment: Acute timepoint = 7 days; Chronic timepoint = 3 weeks

<b>Procedures</b>	<b>Estimated discomfort</b>	<b>AIM 1 Acute</b>	<b>AIM1 Chronic</b>	<b>AIM 2 Acute</b>	<b>AIM 2 Chronic</b>	<b>Total</b>
Body weight measurement	mild	105	105	105	105	420
Neurological scoring	mild	105	105	105	105	420
Blood collection	moderate	105	105	105	105	420
Sham surgery for BCAS	moderate	33	33	33	33	132
BCAS surgery	moderate	72	72	72	72	288
Vessel cannulation	moderate	105	105	105	105	420
CBF measurement and neurovascular coupling	moderate	105	105	105	105	420
Treatment in drinking water or gavage	Mild/moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	105	105	105	105	420
Treatment via SC injection	mild (max 1x/day – acute: max 7 days; not for chronic study)	105	0	105	0	210
Treatment via osmotic minipump	Moderate (max 7 days for acute study; max 3 weeks for chronic study)	0	105	0	105	210
I.V. injection of tracers under anesthesia	mild	105	105	105	105	420
Terminal anesthesia and perfusion	Non-recovery	105	105	105	105	420
<b>Total cumulative discomfort</b>		<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (105)</b>	<b>Moderate (420)</b>

**In summary, a maximum of  $198+132+420 = 750$  mice will experience moderate discomfort (72% of all mice) and a maximum of 288 mice will experience severe discomfort (28% of all mice).**

For further details on the maximal discomfort for each experiment, please see the tables in section B "The Animals" of this appendix. For details on the expected levels of discomfort for the individual procedures, please see the descriptions in section A "Experimental approach and primary outcome parameters"

---

## G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	<p>There is currently no alternative approach allowing the study of cerebral blood flow. There is also no alternative suitable to replace models of stroke and cerebral hypoperfusion.</p> <p>Replacement with human post-mortem material: human post-mortem samples are by definition late-stage pathological tissues that do not allow any functional and longitudinal studies</p> <p>Replacement with human participants: it is important (and mandatory) to perform pre-clinical investigations to assess the validity of the therapeutic approach. Clinical trials are also not suitable for mechanistic understanding of the pathology and treatment. For example, a phase 0 clinical study is aimed at verifying the safety and assessing some pharmacokinetic parameters of a drug but not to solve fundamental research questions. One low, subtherapeutic, dose can be tested in a phase 0 thus limiting the investigations for the study of the regulation of the CBF.</p> <p>Replacement with cells: beyond 2D cell work, 3D cell culture models that includes flow are not capable of reproducing the complexity of the cerebral cellular environment. Furthermore there is no cellular model to date that recapitulates the size of capillaries (6µm diameter) but also no model that allows to perform vasoreactivity studies with capillaries (change in diameter due to circulation of vasoconstrictive/vasodilating agents). We are already investigating the effect of some compounds on middle cerebral arteries mounted in arteriographs. This is useful to test several compounds at multiple doses, investigate some mechanisms but it concerns large vessels (&gt;100 µm) and it is not very informative for the study of microcirculation (~ 6-10 µm) as the expression of receptors, enzymes, ... differ a lot between vascular beds. Therefore our ex vivo investigations – although useful – can not replace the use of animals for the present project. There is also no model that allows the study of neurovascular coupling (i.e. the translation of neuronal activity into a vasodilatory reaction).</p>
Reduction	<p>The number of animals needed for this study has been calculated based on previous studies to ensure a proper statistical power is reached to assess differences in the primary readout parameters. Group size calculation will be performed prior to every working protocol as described in section A of the present appendix.</p>
Refinement	<p>In addition to measures taken to minimize pain and discomfort, environmental enrichment and social housing will be done to improve animal's welfare. Furthermore the animal models have been chosen after careful consideration of alternative models and it has been selected for their pathological relevance, reproducibility and low mortality as described below:</p> <p>Permanent distal Middle Cerebral Artery Occlusion: this is a surgically-induced mouse model of transcranial, permanent coagulation of the middle cerebral artery via electrocoagulation distal of the lenticulostriatal arteries, the so-called "coagulation model". The resulting infarct in this model is located mainly in the cortex; the relative infarct volume in relation to brain size corresponds to the majority of human strokes. Moreover, the model fulfills criteria of reproducibility and low mortality. It has been developed and characterized by the renowned group of Prof Liesz: Llovera, G., et al., Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. <i>J. Vis. Exp.</i> 2014.</p> <p>Bilateral Carotid Artery Stenosis: this procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced by 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm (Shibata et al, White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion <i>Stroke</i> 2004).</p>

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

No

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

---

### H. Re-use

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

No > Continue with question I.

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

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

No

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

### I. Repetition

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

not applicable

### J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Killing at the end of the procedures is necessary for the collection of tissues and material for further ex-vivo/in-vitro characterisation.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Animals will be terminally anaesthetized and undergo a cardiac perfusion protocol for the ex vivo study of brain tissue.

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

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

Naam van het project	nieuwe medicijnen tegen beroerte en dementie
NTS-identificatiecode	NTS-NL-325034 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202216388
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	vasculaire dementie ischemische beroerte cerebrale bloedstroom farmacologie
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	In dit project testen we nieuwe nieuwe medicijnen voor de behandeling van een herseninfarct (beroerte) en van een specifiek type dementie (vasculaire dementie). We onderzoeken of de nieuwe medicijnen de doorbloeding in de hersenen verbetert. We onderzoeken meerdere soorten medicijnen in gezonde en zieke muismodellen, die op een verschillende manier de doorbloeding kunnen verbeteren. Deze medicijnen werken elk op een specifiek onderdeel van een cel.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	De nieuwe medicijnen kunnen hersenbeschadiging door een beroerte of dementie mogelijk beperken of vertragen. Dit onderzoek zal uitwijzen of de gekozen nieuwe medicijnen relevant zijn voor deze ziekten. Als dat het geval is, vervolgstudies te worden uitgevoerd om de behandelingen te valideren. Tenslotte, dienen nieuwe medicijnen te worden vergeleken met de reguliere behandeling van een beroerte en vasculaire dementia om aan te tonen dat de nieuwe behandeling gelijkwaardig of beter is dan de reguliere behandeling.



**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Onderstaande procedures zullen bij sommige, maar niet bij alle diergroepen worden toegepast: bloedafname; een buisje in bloedvaten plaatsen; meten van de doorbloeding in de hersenen; toedienen van medicatie (oraal of injectie); operatie om de doorbloeding van de hersenen te verminderen of een beroerte te veroorzaken; verdoving/narcose om het dier te laten sterven.</p>					
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Procedures zoals bloedafname kunnen enkele minuten zorgen voor stress en lichte pijn. Ingrijpender procedures zoals operaties zullen matig ongerief veroorzaken: het dier wordt verdoofd en krijgt pijnstillers. Verder verwachten we verlies van lichaamsgewicht en verminderd gedrag (verandering in beweging en cognitie) bij dieren die een operatie ondergaan. Bovendien zal een deel van de dieren ook ernstig ongerief ervaren ten gevolge van het opwekken van een beroerte om de effecten van de te testen medicijnen te kunnen besturen.</p>					
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>			
			<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>				
		<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren zullen aan het einde van de experimenten worden opgedood om het effect van de medicijnen op het hersenweefsel te kunnen onderzoeken.</p>					

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>De doorbloeding van de hersenen kan op dit moment niet goed genoeg worden nagebootst in modellen waarbij geen levende dieren nodig zijn (in vitro modellen). Het is ook vereist om deze medicijnen op dieren te testen voordat ze bij patiënten worden getest.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Er zullen niet meer dieren worden gebruikt dan het aantal dat minimaal nodig is om betrouwbare uitspraken te kunnen over de werking van de nieuwe medicijnen. Dat aantal wordt berekend op basis van eerdere studies.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Er zullen maatregelen worden genomen voor zo weinig mogelijk pijn en ongerief bij de dieren. Milieuverrijking en sociale huisvesting zullen worden gedaan om het dierenwelzijn te verbeteren. Daarnaast zijn de diermodellen uitgekozen op basis van hun pathologische relevantie (de kenmerken van de dieren passen bij de ziekten die we onderzoeken), hoge reproduceerbaarheid en lage mortaliteit.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Volwassen muizen zijn geselecteerd voor deze studie omdat 1) een herseninfarct en vasculaire dementie goed kunnen worden veroorzaakt; 2) de doorbloeding van de hersenen goed in beeld is te brengen; 3) omdat ze klein zijn, het maakt het mogelijk om de hoeveelheid te gebruiken medicijnen te beperken; 4) er later genetische onderzoek uit te voeren door het maken van muizen die zijn ontworpen om bepaalde genen tot expressie te brengen. Onderzoek naar beroerte en dementie kan wel worden gedaan bij kleine knaagdieren/zoogdieren maar niet niet kan worden uitgevoerd bij ongewervelde dieren of vissen, omdat ze niet dezelfde ziekte krijgen</p>

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-10-2028
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

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



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD 5.1 lid2h 202216338

**Bijlagen**

3

Datum 17 oktober 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 17 augustus 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216338. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 november 2022 tot en met 31 oktober 2027.

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

*Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

## Procedure

**Datum:**

17 oktober 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD **5.1 lid2h** 202216338

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de **5.1 lid2h** (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 27 september 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 30 september 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de groepsgrootte, de onderbouwing diermodel, het ongerief en de Niet-technische samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## Overwegingen

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

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2028 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## Bezwaar

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

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

# 5.1 lid2h

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

**Datum:**

17 oktober 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD **5.1 lid2h** 202216338



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 november 2022 tot en met 31 oktober 2027, voor het project "Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216338, na advies van 5.1 lid2h . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2h . Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 17 augustus 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 10 oktober 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion, zoals ontvangen op 10 oktober 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 10 oktober 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 27 september 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 10 oktober 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Impact of AT1R biased agonists and sGC stimulators/activators on cerebral perfusion in healthy mice and mice subjected to ischemic stroke or cerebral hypoperfusion</b>			
	Muizen (Mus musculus) / C57BL6/J	1.038	28,0% Ernstig 72,0% Matig

## Voorwaarden

### Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

**Aanvraagnummer:** AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202216338

### **Geldende voorschriften**

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

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.





**Aanvraagnummer:**

AVD<sup>5.1 lid2n</sup> 202216338

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

**Aanvraagnummer:**AVD 5.1 lid2f 202216338

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

**Beoordeling achteraf**

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

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** dinsdag 18 oktober 2022 09:20  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216338

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 17-08-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Pharmacological interventions to improve cerebral perfusion' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216338.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de groeps grootte, de onderbouwing diermodel, het ongerief en de Niet-technische samenvatting.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 17-10-2022.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

De CCD wilt u bedanken voor de duidelijke weergave van het minderheidsstandpunt van het ene DEC lid. Ook de aangekaarte dilemma's heeft u duidelijk weergegeven.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)