



01 SEP. 2015

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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

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 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | <table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr></table> | Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] | KvK-nummer | 4 1 0 5 5 6 2 9 | | | | | | | | | |
| Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KvK-nummer | 4 1 0 5 5 6 2 9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Groteplein 10</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr></table> | Straat en huisnummer | Geert Groteplein 10 | Postbus | 9101 | Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen | IBAN | NL90ABNA0231209983 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud | | | | | |
| Straat en huisnummer | Geert Groteplein 10 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postbus | 9101 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IBAN | NL90ABNA0231209983 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Postdoc</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | Functie | Postdoc | | Afdeling | [REDACTED] | | Telefoonnummer | [REDACTED] | | E-mailadres | [REDACTED] | |
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | Postdoc | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>UHD</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | Functie | UHD | | Afdeling | [REDACTED] | | Telefoonnummer | [REDACTED] | | E-mailadres | [REDACTED] | |
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | UHD | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur


5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
 DEC-advies, factuurinformatie

6 Ondertekening


- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). 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 F 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 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 31 - 08 - 2015

Handtekening 

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease |

2 Categories

- | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures <input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The two most common types of dementia in the elderly are Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia (VaD). AD is characterised by progressive cognitive impairment (e.g. memory loss) and accumulation of amyloid (A β) and tau protein in the brain parenchyma and vasculature [1]. Cognitive impairment in VaD is the result of strokes in the brain and is often more stepwise than progressive [2]. AD and VaD have therefore long been treated as two separate types of dementia.

Epidemiological studies have recently established that CVD, VaD and AD are more closely linked than previously thought. For example, CVD and AD share a great number of (vascular) risk factors, including diabetes, atherosclerosis and high blood pressure [3]. Furthermore, other vascular abnormalities, such as decreased microvascular density and basement membrane thickening [4], can be detected in many AD brains. AD patients also have a higher risk for stroke [5], with about 30-50% of AD patients displaying evidence of minor and major stroke upon autopsy [6]. Although it is known that stroke can contribute to the severity of cognitive impairment in AD [7], the exact role of stroke in AD remains to be investigated. In any case, vascular disorders and AD can no longer be considered strictly separate conditions. So-called mixed dementia, with post-mortem pathological evidence for both CVD and AD, is now thought to be much more common in the elderly than any of the 'pure' forms of dementia [8]. The clinical criteria to distinguish mixed dementia from AD and other dementias however remain to be clearly defined.

Clinically diagnosing AD, VaD and other types of dementia requires a neurological evaluation of the patient combined with an evaluation of cerebrospinal fluid biomarkers (e.g. A β and tau) and/or neuroimaging profiles. Neuroimaging techniques provide a wide range of structural and functional information that quite accurately reflect neuropathology upon autopsy [9]. Recent advances in imaging techniques now allow for the *in vivo* visualization of parameters such as brain connectivity (resting state functional magnetic resonance imaging; rs-fMRI), gray and white matter integrity (diffusion tensor imaging; DTI) and blood perfusion (arterial spin labelling; ASL). In dementia and CVD, imaging has provided valuable differential diagnostic information, demonstrating for example the atrophy patterns and A β deposits typical for AD [10] and the lesions and network reorganizations associated with CVD [11]. It can be hypothesized that a distinctive imaging pattern of neuropathology accompanies AD that is

preceded by a stroke event. Indeed, despite possessing a course of disease suggestive of AD, imaging has revealed that mixed dementia patients have a higher rate of white matter changes than AD patients [12]. To our knowledge, this is the only imaging data on mixed dementia to date, emphasizing the need for further investigation of the neuroimaging patterns associated with this type of dementia.

To investigate the pathogenic mechanisms behind AD, transgenic animal models for AD, expressing (mutant forms of) the amyloid precursor protein (APP), have been developed. Stroke is most commonly modelled in mice by occluding the left or right middle cerebral artery (MCA) [13], either transiently (30-120 minutes) or permanently. The longer the MCA is occluded, the more severe the infarct that is generated will be. Previous studies have demonstrated that the induction of an ischemic event in AD mouse models can exacerbate AD pathology and ischemic lesion size, accompanied by an increased disturbance of cognition [14-16], thus mimicking what is seen in AD patients with stroke. None of these animal studies have however examined neuroimaging parameters, they have mainly focused on elucidating the bidirectional interaction between APP/A β and ischemic injury and the potential role of inflammation. As advanced neuroimaging techniques are now available for small animals such as mice [17, 18], it is feasible to gain more insight into AD pathology and the role of stroke. These techniques will furthermore allow for an extensive structural and functional assessment of future treatments for stroke and/or AD.

Currently, treatment strategies for AD and stroke are still lacking. As both CVD and AD share a number of vascular risk factors [3], therapeutically addressing these factors may be beneficial for both conditions. In the Western population, vascular risk factors are closely linked to the consumption of high amounts of cholesterol, calories and saturated fats. Therefore, it can be hypothesized that changing to a healthier diet may improve the development and severity of both AD and stroke. Indeed, the so-called Mediterranean diet, consisting of relatively high amounts of fish, fruit and vegetables, has been shown to lower CVD and AD incidence and risk [19, 20]. Certain diets have even been shown to improve some of the brain damage associated with stroke and AD. For example, we have previously shown that a [REDACTED] diet, containing a specific combination [REDACTED], has a beneficial effect on neurodegenerative processes, cerebral blood flow and cognition in a mouse model for AD [21-23] and wildtype mice modelling stroke (unpublished data). It remains to be investigated if a [REDACTED] diet can also improve mixed dementia pathology and symptoms.

In conclusion, as mixed dementia is now recognized as a common form of dementia, there is a need to further characterize this type of dementia and distinguish it from 'pure' forms of AD and other dementias. Furthermore, the lack of available treatments for CVD and dementias highlights the importance of testing novel treatment strategies, for example aimed at common risk factors for both these conditions. The availability of suitable mouse models and advanced neuroimaging techniques makes the above-mentioned studies possible. It should be mentioned that sex is an important risk factor for both AD and stroke, as both conditions appear to affect women more than men [24, 25]. In contrast, male sex is considered a risk factor for mixed dementia [26]. Taking this factor into account when designing epidemiological or experimental studies investigating (mixed) dementia therefore seems highly relevant, but is in our opinion too often ignored. In our current project, we will therefore examine the effect of stroke on AD in both sexes of a mouse model for mixed dementia.

References

1. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
2. Pasquier, F. and D. Leys, *Why are stroke patients prone to develop dementia?* J Neurol, 1997. **244**(3): p. 135-42.

3. Breteler, M.M., *Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(2): p. 153-60.
4. Humpel, C., *Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease?* Exp Gerontol, 2011. **46**(4): p. 225-32.
5. Chi, N.F., et al., *Alzheimer disease and risk of stroke: a population-based cohort study*. Neurology, 2013. **80**(8): p. 705-11.
6. Kalaria, R.N., *The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(2): p. 321-30.
7. Snowdon, D.A., et al., *Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study*. JAMA, 1997. **277**(10): p. 813-7.
8. Schneider, J.A., et al., *Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons*. Neurology, 2007. **69**(24): p. 2197-204.
9. Roman, G. and B. Pascual, *Contribution of neuroimaging to the diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia*. Arch Med Res, 2012. **43**(8): p. 671-6.
10. Masdeu, J.C., W.C. Kreisl, and K.F. Berman, *The neurobiology of Alzheimer disease defined by neuroimaging*. Curr Opin Neurol, 2012. **25**(4): p. 410-20.
11. Dijkhuizen, R.M., et al., *Functional MRI and diffusion tensor imaging of brain reorganization after experimental stroke*. Transl Stroke Res, 2012. **3**(1): p. 36-43.
12. Rockwood, K., et al., *The diagnosis of "mixed" dementia in the Consortium for the Investigation of Vascular Impairment of Cognition (CIVIC)*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **903**: p. 522-8.
13. Chiang, T., R.O. Messing, and W.H. Chou, *Mouse model of middle cerebral artery occlusion*. J Vis Exp, 2011(48).
14. Heikkinen, R., et al., *Susceptibility to focal and global brain ischemia of Alzheimer mice displaying abeta deposits: effect of immunoglobulin*. Aging Dis, 2014. **5**(2): p. 76-87.
15. Koistinaho, M., et al., *Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1610-5.
16. Zhang, F., et al., *Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein*. J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7655-61.
17. [REDACTED]
18. [REDACTED]
19. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. N Engl J Med, 2013. [REDACTED]
20. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2006. **59**(6): p. 912-21.
21. [REDACTED]
22. [REDACTED]
23. [REDACTED]
24. Andersen, K., et al., *Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies*. EURODEM Incidence Research Group. Neurology, 1999. **53**(9): p. 1992-7.
25. [REDACTED]
26. Zekry, D., J.J. Hauw, and G. Gold, *Mixed dementia: epidemiology, diagnosis, and treatment*. J Am Geriatr Soc, 2002. **50**(8): p. 1431-8.

3.2 Purpose

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

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

The main objectives of this project are:

- 1) Study the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain to a) find novel (sex-specific) neuroimaging markers and/or predictors for mixed dementia and b) further elucidate (sex-specific) pathophysiological mechanisms linking stroke and AD.
- 2) Investigate the effect of a [REDACTED] diet on stroke- and AD-related cognition and brain network integrity.

To realize our objectives, mild experimental stroke will be induced in a mouse model for AD. Inducing stroke in mice has been well-described in literature (see section 3.1) and we have experience with the induction of ischemia in mice (unpublished data). To optimize the success rate of this procedure, experimental stroke induction will be performed in close collaboration with expert researchers in the field. We furthermore have access to the necessary neuroimaging facilities and behavioural equipment and have the required experience to perform neuroimaging ([REDACTED] and behavioural studies [REDACTED]. We have extensive experience working with mouse models for [REDACTED] and have extensive knowledge on the effects of [REDACTED] diets in both AD (references [REDACTED] and stroke models (unpublished data). Considering the above-mentioned experience, we believe that our objective is achievable in the 5 years requested for this project.

Additional references

[REDACTED]

3.3 Relevance

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

Social: AD is a major public health problem with patient numbers growing each year due to the aging of the world population. In part due to the highly heterogeneous nature of dementia, definite clinical diagnostics and effective treatment strategies are still lacking. Mixed dementia is now considered more common than 'pure' AD, but this type of dementia is hardly recognized to date. Distinguishing mixed dementia from other types of AD is relevant as for example patients suffering from this type of dementia may benefit from different (stroke-directed) treatment options than 'pure'

AD patients. Therefore, defining neuroimaging parameters specific for mixed dementia will not only benefit the differential diagnosis of dementias, it may potentially improve treatment outcome for a large group of dementia patients. Including the risk factor sex may furthermore enhance the personalized healthcare strategy, i.e. diagnostics and treatments tailored to individual patients, that is receiving increasing attention in medicine today.

Scientific: It is still unclear if ischemic events can potentiate the development of classical AD lesions or if they are a consequence of pre-existing AD pathology. It is furthermore unknown what the exact role of the risk factor sex is on the aforementioned pathology. Investigating the effect of mixed dementia and a dietary intervention on neuroimaging parameters should give us more insight into the pathological mechanisms involved in this type of dementia and the potential role of gender. This in turn may result in the identification of novel (sex-specific) therapeutic and/or diagnostic targets.

3.4 Research Strategy

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

We aim to:

- 1) Investigate the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain by inducing experimental stroke in transgenic for APP (AD mouse model). To better align this animal experiment to different stages of human AD development, we have chosen a longitudinal design for our study. To investigate the potential role of sex, both male and female mice will (simultaneously) be used.
- 2) Investigate the acute effect of a [REDACTED] diet on cognition and neuroimaging markers after the induction of experimental stroke in mice transgenic for APP. To investigate the potential role of sex, both male and female mice will (sequentially) be used.

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

This project will consist of two components, as specified in 3.4.1. The outline of these components is as follows:

- 1) In a transgenic mouse model for AD, motor skills and physiological parameters will be determined shortly before (baseline) and shortly after experimental stroke induction in both sexes. Shortly after a mild experimental stroke is induced, several neuroimaging techniques, such as [REDACTED] will be used to examine brain structure and function. To assess perfusion, parameters such as cerebral blood flow and vasoactivity will also be measured with imaging techniques (e.g. arterial spin labelling; ASL). The chosen neuroimaging paradigm will be repeated at least two times with a time interval of several months. Furthermore, to assess the efficacy of the ischemic stroke and the level of AD pathology, behaviour, cognition and/or motor skills will be measured at least once after the ischemic stroke, using tests such as the open field, Morris water maze and grip test. Physiological parameters (e.g. blood pressure, body weight, etc) will be monitored throughout the experiment to assess the impact of stroke and/or age-related AD pathology on the general health of the animals. Six to eight months after experimental stroke induction, mice will be sacrificed.
- 2) In a transgenic mouse model for AD, baseline cognitive and motor skills and physiological parameters will be determined shortly before experimental stroke induction. Immediately after mild experimental stroke is induced, half of the mice will be switched from a control diet to a [REDACTED] diet. A few weeks after induction of stroke, a neuroimaging paradigm similar to the one performed in component 1 will be performed to examine brain structure, function and perfusion. Furthermore, the effect of diet will be assessed in a number of behavioural tests, such as the Barnes or Morris water maze and the open field. Physiological parameters (e.g. body weight, etc) will be monitored throughout the experiment to

assess general health of the animals and the impact of stroke and/or age-related AD pathology and/or diet on the general health of the animals. About two months after experimental stroke induction, mice will be sacrificed. Due to the large number of variables being tested (e.g. diet and stroke and AD), this experiment will first be performed only in males. If improvements of treatment with a [REDACTED] diet are found in males, component 2 will be performed once more in females.

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

In the two components of this project we will try to elucidate the mechanistic, diagnostic and therapeutic implications of mixed dementia. To this end, in both components we will induce mild experimental stroke in a mouse model for AD. The first component is aimed at finding novel neuroimaging markers for mixed dementia and elucidating pathological mechanisms in this type of dementia. In this component we will furthermore take the risk factor sex into account. The second component is aimed at determining the potential therapeutic effect of a [REDACTED] diet on this type of dementia.

To study this we formulated the following milestones:

1. Combining AD pathology with stroke leads to novel (sex-specific) neuroimaging patterns that can distinguish this type of dementia from 'pure' AD and provide more mechanistic insight into mixed dementia pathology. If no immediate effects of stroke on neuroimaging and/or motor parameters are found in the first two subgroups of mice that undergo experimental stroke (see appendix 1), we will not continue with the remainder of appendix 1 or appendix 2 ('go/no go' point).

As soon as (early) stroke-related changes in neuroimaging and/or motor or behavioural parameters are found in component 1 ('go/no go' point), we may start with component 2 in which we hypothesize that:

2. Treating mixed dementia with a [REDACTED] diet acutely improves cognition and/or improves brain network integrity in male mice. If these effects of diet are seen in males ('go/no go' point), the same effect will be studied in female AD mice.

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

| Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters |
| 2 | Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters |

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

| | | | |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number 1 | Type of animal procedure Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters |

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.

With the animal procedures described in this appendix, we aim to investigate the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the Alzheimer's disease (AD) brain. To this end we will induce mild experimental stroke in mice transgenic for amyloid precursor protein (APP) (AD mouse model) and wildtype controls and, as a primary outcome parameter, collect neuroimaging data. Imaging the brain is a non-invasive way to assess brain function and structure during life and is therefore the best tool to assess these parameters. Furthermore, as imaging is non-invasive, these techniques can be performed several times in the same animal, allowing for a longitudinal follow-up of individual mice. In our opinion, a longitudinal design better aligns the animal experiment to the different stages of human AD development, increasing the relevance of our study.

A secondary outcome parameter of our study is the cognitive and motor function of AD mice with experimentally induced mild stroke. Both cognition and motor skills are known to be affected by AD and (experimental) stroke and it is therefore relevant to assess a potential cumulative effect of AD and stroke on these parameters. We will select tests that are not too severe for the animals to perform while still relaying relevant data.

Experimental stroke will be induced by transiently occluding the middle cerebral artery (MCAO) in the experimental groups. Before starting the actual experiment, the entire MCAO procedure will be optimized in surplus mice available at the animal facility of [REDACTED]. The neuroimaging procedure will be optimized in a few more surplus mice (that have not been used for MCAO practice). Finally, as gender is an important risk factor of both AD and stroke, we believe it is highly relevant to relate the aforementioned primary and secondary outcome parameters to the sex of the mice. We will therefore use both male and female mice in the actual experiment.

In summary, the general design of the actual experiment is as follows:

1. Measuring physiological parameters and assessing baseline motor skills (coordination tests)
2. Inducing mild experimental stroke by transient MCAO (followed by at least one week of recovery)
3. Motor tests and physiological parameters (1-3 weeks after MCAO)
4. Neuroimaging paradigm (2-4 weeks after MCAO)
5. Repeat of neuroimaging paradigm (one or two times, with several months between paradigms)
6. Behavioral and motor tests (several months after MCAO)
7. Final neuroimaging paradigm and sacrifice (6-8 months after MCAO)

For practical reasons, a maximum of 40 animals can be handled at one time when inducing experimental stroke. Therefore, the total number of mice needed to obtain statistically relevant data will be subdivided in at least four subgroups.

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

A few weeks before experimental stroke induction, mice are moved to the animal facility where neuroimaging and behavioural tests will be performed (PRIME) and acclimatized for at least one week. As motor skills will be affected by stroke induction, 2-4 simple motor tests will be performed prior to stroke induction (assess baseline motor skills). We will choose tests that are relatively undemanding for the mice (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) and have been performed in previous studies assessing the motoric consequences of MCAO. Right before experimental stroke induction, baseline physiological parameters (body weight etc.) will be registered to monitor the health of the animals. As we expect blood pressure (BP) to be affected by both AD pathology and stroke, we will measure BP as an additional physiological parameter. We will select a non-invasive way of measuring BP (tail cuff plethysmography). This method will likely require a few days of habituating the mice to the measurement equipment. This habituation will take place one or two weeks before experimental stroke induction. After habituation, BP will be measured at regular time intervals during the entire experiment.

Transient mild experimental stroke, resulting in focal ischemia, will be induced in young adult transgenic AD mice and age-matched wildtype controls (e.g. littermates) by occluding the middle cerebral artery (MCAO) under general, adequate anaesthetics for a maximum of 30 minutes. MCAO is a well-described and robust method to induce experimental stroke in mice [1]. To estimate occlusion success, cerebral blood flow will be monitored during surgery using Laser Doppler Flow. After surgery, all mice are individually housed and allowed to recover for at least one week. After the recovery period, physiological parameters will be carefully monitored and proper analgesia will be given to reduce any discomfort or pain. Furthermore, expected neurological deficits, such as forelimb weakness and circling to the affected side, will be determined and the aforementioned motor tests (e.g. Pole test, Corner test, Grip test) will be performed to assess the success of the MCAO. A separate group of AD and wildtype mice will receive a sham operation, undergoing similar anaesthetics and surgery but not the actual MCAO (i.e. reduction in blood flow). Sham-operated animals will, among other things, allow us to better assess the effects of stroke on cognition in both wildtype and AD mice.

Two to four weeks after the recovery period, a first set of non-invasive neuroimaging experiments will be performed to measure parameters such as lesion size (diffusion weighted imaging; DWI), neuronal connectivity (resting state functional magnetic resonance imaging; RS-fMRI) and cerebral blood flow (arterial spin labelling; ASL). For neuroimaging, mice are anaesthetised using isoflurane via inhalation. During the neuroimaging experiments, physiological parameters such as heart rate and body temperature are closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. The entire neuroimaging paradigm (e.g. RS-fMRI, DWI, ASL) will take a maximum of 2 hours per mouse, after which mice are allowed to awake and recover. The paradigm will be repeated one or two more times with a (regular) time interval of several months.

Six to eight months after MCAO, potential cognitive deficits and motor abnormalities will be assessed in the aforementioned motor tests (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) and behavioural tests such as Open field and the Barnes or Morris water maze. Similar behavioural tests have been performed in previous studies exploring the effects of ischemia in AD mouse models and will therefore allow for a comparison of our study with these previous studies. In total, these motor and behavioural tests may take up to two weeks to perform. A few days after the last behavioural test has been performed, the aforementioned neuroimaging paradigm will be performed one last time for each mouse (6-8 months after MCAO). Immediately after these scans, mice will be sacrificed without arousal from the anaesthesia.

It should be mentioned that, supervised by experienced technicians/researchers from inside and outside [REDACTED] all involved researchers/technicians will practice experimental occlusion on surplus wildtype mice to optimize the success rate of the

occlusion in the actual experiment. As positioning the mice in the scanner and operating the scanner requires some skill, the neuroimaging procedures will also be optimized before the start of the actual experiments. This optimization should minimize stress for the animals used during the actual neuroimaging experiments.

References

1. Macrae, I.M., *Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1062-78.

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

G*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ($P < 0.05$; Power: 0.80). To estimate effect size (d), comparable studies previously performed by us and described in literature are explored. Furthermore, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. Finally, randomly assigning mice to the sham and MCAO groups and treating and housing both groups similarly, should also contribute to minimizing group sizes.

MCAO will be practiced on surplus mice before the actual experiment takes place, to ensure MCAO is successful in as much of the requested mice as possible during the actual experiment. With a separate set of surplus animals the neuroimaging procedure will be practiced to ensure experienced handling of the mice during the actual neuroimaging procedures.

B. The animals

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

Species: For several reasons, we will use mice (*Mus musculus*) for our project. Not only is AD mostly modeled in mice, stroke induction is also well-validated in this species. Furthermore, on a more practical note, [REDACTED] we will use for neuroimaging is only accessible to mice. We are highly experienced working with mice and AD mouse models in particular.

Origin: 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'

Estimated numbers: Based on the power analysis and taking the expected mortality rates of MCAO and Sham in wildtype (~35% and ~0% resp.) and AD mice (~60% and ~10% resp.) into account, we expect to need about 180 mice (90 male and 90 female, 40% wildtype and 60% AD mice) for the actual experiment. Mortality rates are based on previous experiments (e.g. [1]) and may be the result of unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage) and/or, in case of seizure-prone AD mice [2], prolonged seizing. With this total number of mice, we expect to ultimately, after MCAO-related mortality, end up with the required number of mice to obtain statistically relevant data ($n = 14-15$ per experimental group). Both male

and female mice will be divided into the following experimental groups: wildtype-Sham, AD-Sham, wildtype-MCAO and AD-MCAO. We furthermore expect to need about 50 surplus wildtype mice to optimize MCAO and neuroimaging.

Life stages: The level of AD pathology, rather than aging, is leading in choosing the suitable life stage of the mice. For the experiment described in this appendix, we will induce mild experimental stroke in young adult mice that have a minimal amount of AD pathology (representing early stage of AD). This will allow us to longitudinally monitor stroke-related effects on AD pathology development, thus aligning this animal experiment to different stages of human AD development. Mice will be sacrificed when they are mature adult mice (representing advanced stage of AD).

1. Kemppainen, S., et al., *Behavioral and neuropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model mice*. Behav Brain Res, 2014. **275**: p. 15-26.
2. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------|
| mouse | 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen' | 230 | young adult |

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: To study the complex interaction of both stroke and AD on brain structure and function, it is not possible to use relatively simple animals or *in vitro* models. We have chosen mice as these animals are 1) the most commonly used to model the pathology of AD (i.e. amyloid deposition) and 2) they are, with rats, the only animals where MCAO is performed to experimentally induce stroke. Finally, using mice allows us to study stroke and AD-related behavioural and neurological deficits, parameters that cannot be studied *in vitro*, but are highly relevant when translating findings to human studies.

Reduction: This experiment cannot be performed with less animals, as the chosen numbers have been carefully calculated to obtain statistically relevant results while taking a high expected mortality rate, as a result of the MCAO and the development of AD, into account. Furthermore, as previously mentioned, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. We will further minimize the number of mice needed by choosing a longitudinal rather than a cross-sectional study design. Mortality rates will be kept as low as possible by optimizing MCAO and neuroimaging with wildtype surplus mice before starting the experiment described in this appendix.

Refinement: There are currently no other techniques available to model ischemic stroke with less discomfort to the mice than the MCAO technique we will use. However, several measures will be taken to minimize pain and distress of the animals. For example, mild experimental stroke will be induced using standard operating methods and under general anesthetics. We will furthermore use a relatively non-invasive method of MCAO (e.g. no opening of the skull) and use occlusion tools that insure high reproducibility of the lesion size in different mice. To optimize the success rate, mild experimental stroke induction will furthermore be optimized and/or performed in close collaboration with expert researchers in the field. Neuroimaging experiments will also be optimized and performed under anaesthesia to minimize distress. The least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures to further minimize stress levels. Finally, it should be mentioned that mice will receive ample time to recover from the most distressing procedures before a new stressful procedure is started.

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

To minimize animal suffering, pain and fear the most distressing and painful procedures will be performed by experienced technicians/researchers. Furthermore, general anaesthesia and optimal post-surgery care, including analgesia, will be given. Only after a suitable recovery period will further animal procedures be performed. When possible, mice will be habituated to any tools or procedures that may be considered stressful to the animals, including certain behavioural setups (e.g. Pole test, Open field) and the measurement of blood pressure.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable (not legally required)

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

After the occlusion, the animals will be individually housed to optimize healing of the surgical wound and better monitor physiological parameters (food intake etc.) and stroke-related abnormalities (e.g. abnormal motor function). Female mice in particular will experience discomfort as a result of the individual housing (severity: mild). If the mice do not demonstrate aggressive behavior (e.g. biting etc), after the recovery period they will again be group-housed.

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

To relieve the pain associated with the surgery, analgesia will be given just before starting the surgery and, depending on the observed discomfort of the animals, up to 7 days after experimental stroke induction. To select proper analgesia, veterinarians and animal technicians will be consulted.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All mice will experience (mild) discomfort from stressors (e.g. handling, individual housing, motor and behavioral testing) associated with the different experiments outlined in section 2A (general design). Furthermore, despite proper post-operative care and the relative mild nature of the stroke induced, several adverse effects of the experimental stroke are to be expected. For example, stroke induction will result in neurological deficits, such as forelimb weakness and incessant circling to the affected side. In AD mice these neurological deficits may be more severe. Furthermore, modelling AD in mice often makes these animals more sensitive to (the aforementioned) stressors, resulting in side-effects such as seizures [1]. Inducing stroke in these models is expected to increase these adverse (stress-related) side-effects. These side-effects in turn are expected to increase mortality rates, especially in stroke-induced AD mice. Finally, adverse effects of the anaesthetics, e.g. isoflurane, may also be expected. These may include respiratory depression and a decrease in blood pressure.

1. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Explain why these effects may emerge.

Modelling AD in mice often results in increased sensitivity to stress due to the pathological accumulation of amyloid in the brains of these mice. Induction of experimental stroke can be considered stressful and will furthermore impair a part of the brain due to ischemia, thus resulting in neurological and/or behavioural deficits. Combining both pathologies in AD mice is expected to increase the vulnerability of these mice in particular.

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

To minimize (stress-related) adverse side-effects and mortality, we have chosen an MCAO technique that is relatively non-invasive (no opening of the skull). Furthermore, both MCAO and neuroimaging will be practiced and the least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures. Our extensive experience with AD mouse models should further minimize any stress resulting from for example housing conditions or handling. During anaesthesia, heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. If any detrimental effects of anaesthesia are observed, the level of anaesthesia will be rapidly adjusted. When necessary, humane endpoint sacrifices will be performed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The animals will be prematurely euthanized if during MCAO surgery a decrease in regional cerebral blood flow (rCBF) of >80% of baseline is not reached (Note that a rCBF decrease of >80% during surgery is indicative of successful stroke induction). During the recovery period humane endpoints will be reached when 1) the animal stops eating or drinking, 2) body weight drops over 15% in two days or decreases >20% from its initial weight, 3) severe circulatory or breathing problems occur and/or 4) severe and persistent wound bleeding or infection occurs. Abnormal behavior and motor skills are to be expected, but if 35 days after MCAO surgery animals show only 50% motor activity, they will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

Estimated likely incidence of humane endpoints:

- Euthanization when rCBF reduction of >80% is not reached: 5% (MCAO groups)
- Euthanization during recovery period: 0-5% (highest incidence expected with MCAO, lowest with Sham)

Thus, 5-10% of the total expected mortality rates (Sham: 0% in wild-types, 10% in AD mice; MCAO: 35% in wild-types, 60% in AD mice) can be explained by humane endpoints, the remainder may be attributed to unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage; 25%) and/or AD pathology (5-25%).

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Practicing the experimental stroke procedure (under anaesthesia) is classified as non-recovery. During the actual experiment, the level of discomfort associated with inducing mild experimental stroke under anaesthesia with recovery can be classified as moderate. This procedure is imperative to the design of the study and therefore cannot be avoided. Each neuroimaging paradigm (under anaesthesia) can be considered mildly discomforting as are all the individual behavioural and coordination tests. To assess general health, several mildly discomforting procedures (handling, weighing etc) will to be performed. Half of the mice will model AD by depositing amyloid protein in their brain, a pathology than gives these mice additional mild discomfort mainly due to the mild epileptic seizures that are associated with the stress-sensitivity of AD mice. We expect these seizures, that will mostly be so small that they are hardly discernable, to occur in >50% of AD mice. The induction of mild stroke is expected to exacerbate the discomfort associated with AD pathology by for example prolonging seizure duration and/or increasing the number of small seizures. Discomfort due to AD pathology in stroke-induced AD mice is therefore expected to be moderate.

Combining the above-mentioned discomfort levels and taking the duration of the experiment into account, we expect the overall level of discomfort to be classified as 'moderate' (all wildtype mice and sham-operated AD mice; 60%) and 'severe' (AD mice with MCAO; 40%). Mice will be given ample time to recover from each moderate procedure before undergoing another procedure at this level of discomfort. The final neuroimaging paradigm will be non-recovery (terminal under anaesthesia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Immediately after the last neuroimaging paradigm the mice will be sacrificed to study stroke lesion size, amyloid beta deposition and other relevant molecular markers (e.g. inflammation) in the brains of these mice.

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

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

| | | | |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number 2 | Type of animal procedure Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters |

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.

With the animal procedures described in this appendix, we aim to investigate the acute effect of treatment with a [REDACTED] diet on mixed dementia cognitive impairment and neuroimaging parameters. Due to the large number of variables that will be addressed in the animal procedures described in this appendix (e.g. stroke, AD, diet, neuroimaging, cognition etc.), we have decided not to use both sexes simultaneously in this component of our project. We will first perform the experiment described in this appendix using male mice. When we see beneficial effects in males, we will also perform the experiment in female mice.

The set-up of the proposed animal procedures will be similar to an as yet unpublished experiment performed by us using wildtype mice (+experimental stroke, [REDACTED] diet). Male mice were used in this previous study, therefore to make comparisons we will also start the current experiment with males. We will induce mild experimental stroke (MCAO) in mice transgenic for amyloid precursor protein (APP)(AD mouse model) and wildtype controls and then feed half of the mice with a [REDACTED] diet containing ingredients such as specific phospholipids and vitamins that may contribute to brain repair. The other half of the mice will be fed a control diet (similar to standard rodent chow) with similar caloric values (isocaloric) as the [REDACTED] diet.

As a primary outcome parameter, we will collect behavioural data. Not only are cognition and motor skills known to be affected by both AD and (experimental) stroke, these skills can be attenuated by dietary intervention. It remains to be investigated what effect a [REDACTED] diet has on mixed dementia. To evaluate behavioural parameters, such as learning and memory, many well-described and highly recognized cognitive tests are available for mice.

As a secondary outcome parameter of these animal procedures, neuroimaging data will be collected to determine if a [REDACTED] treatment can enhance brain network recovery and brain circulation. Imaging the brain is a non-invasive way to assess brain function and structure during life and is therefore the best tool to assess these parameters. Collecting neuroimaging data will furthermore allow for a comparison with the mice used in the animal procedures described in appendix 1.

In summary, the general design of the actual experiment is as follows:

1. Measuring physiological parameters and assessing baseline motor skills (coordination tests)
2. Behavioural experiment measuring baseline cognition
3. Inducing mild experimental stroke by transient MCAO and switching to a multi-nutrient or isocaloric control diet (followed by at least one week of recovery)
4. Coordination tests and physiological parameters (immediately after recovery)
5. Neuroimaging paradigm (about two weeks after MCAO)
6. Behavioural and coordination tests (about 1½ months after neuroimaging)

7. Neuroimaging paradigm and sacrifice (about 2 months after MCAO)

For practical reasons, a maximum of 25 animals can be handled at one time in the behavioural experiment measuring baseline cognition. Therefore, the total number of mice needed to obtain statistically relevant data will be subdivided in at least three subgroups per sex.

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

We will first perform these experiments in male mice. When effects are found in males, the same experiment will also be performed in female mice.

A few weeks before experimental stroke induction, mice are moved to the animal facility where behavioural tests and neuroimaging will be performed [redacted] and acclimatized for at least one week. At this time, mice will be fed with control diet (similar to regular rodent chow). As motor skills will be affected by stroke induction, 2-4 motor tests will be performed prior to stroke induction (assess baseline motor skills). We will choose tests similar to the ones performed in appendix 1 (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) as well as one or two more strenuous motor tests that have been performed in previous MCAO studies (e.g. Rotarod). One cognition test, such as the Barnes or Morris water maze, will be performed in one of the weeks prior to stroke induction to assess baseline cognition (learning/memory). Furthermore, right before experimental stroke induction, baseline physiological parameters (e.g. body weight etc.) will be registered to monitor the health of the animals.

Transient mild experimental stroke, resulting in focal ischemia, will be induced in mature transgenic AD mice and age-matched wildtype controls (e.g. littermates) by occluding the middle cerebral artery (MCAO) under general, adequate anaesthetics for a maximum of 30 minutes. MCAO is a well-described and robust technique to induce experimental stroke in mice [1]. To estimate occlusion success, cerebral blood flow will be monitored during surgery using Laser Doppler Flow. After surgery, all mice are individually housed and half of the mice will be switched from a control diet to a [redacted] diet while the other half remains on the (isocaloric) control diet (similar to regular rodent chow). The animals will be kept on these diets for the remainder of the experiments. Mice are allowed to recover from the MCAO for at least one week. During the recovery period, physiological parameters will be carefully monitored and proper analgesia will be given to reduce any discomfort or pain. Immediately after the recovery period, expected neurological deficits, such as forelimb weakness and circling to the affected side, will be determined and the aforementioned motor tests (e.g. Rotarod, Pole test, etc) will be performed to assess the success of the MCAO.

About two weeks after the MCAO, neuroimaging experiments will be performed to measure parameters such as lesion size (diffusion weighted imaging; DWI), neuronal connectivity ([redacted]) and cerebral blood flow (arterial spin labelling; ASL). For neuroimaging, mice are anaesthetised using isoflurane via inhalation. During the neuroimaging experiments, physiological parameters such as heart rate and body temperature are closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. The entire neuroimaging paradigm ([redacted]) will take a maximum of 2 hours per mouse, after which mice are allowed to awake and recover.

Two to four weeks after neuroimaging, potential motor abnormalities and behavioural and cognitive deficits will be assessed in the aforementioned motor tests (e.g. Rotarod, Pole test and Corner test) and behavioural tests such as open field or the Barnes or Morris water maze. Similar behavioural tests have been performed in previous studies exploring the effects of ischemia in AD mouse models. We have also performed such tests in our previous study exploring the effect of [redacted] diet in wildtype mice with experimental stroke (unpublished data). Therefore, these tests

will allow for a comparison of our study with these previous studies. In total, these tests may take up to two weeks to perform. A few days after the last behavioural test has been performed, the aforementioned neuroimaging paradigm will be performed once more. Immediately after these scans, mice will be sacrificed without arousal from the anaesthesia.

References

1. Macrae, I.M., *Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1062-78.

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

G*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ($P < 0.05$; Power: 0.80). To estimate effect size (d), comparable studies previously performed by us and described in literature are explored. Furthermore, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. The composition of the [REDACTED] diet will also be carefully chosen based on previous experiences with these type of diets. To assess the effects of MCAO, we gave chosen to test cognition before and after stroke induction and comparing the brain structure of contra- and ipsilateral sides of the same brain, thus minimizing the number of (control) animals needed. Randomly assigning mice to the control diet and [REDACTED] diet groups and treating and housing both groups similarly, should also contribute to minimizing group sizes.

B. The animals

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

Species: For several reasons, we will use mice (*Mus musculus*) for our project. Not only is AD mostly modeled in mice, stroke induction is also well-validated in this species. Furthermore, on a more practical note, the [REDACTED] we will use for neuroimaging is only accessible to mice. We are highly experienced working with mice and have studied the effects of [REDACTED] diet in mice before, allowing for comparisons with these previous mouse studies.

Origin: 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'

Estimated numbers: Based on the power analysis and taking the expected mortality rates with MCAO in wildtype (~35%) and AD mice (~60%) into account, we expect to need at least 120 mice (males only) and a maximum of 240 mice (males and females) (40% wildtype and 60% AD mice; 50% on control diet and 50% on [REDACTED] diet) for the experiment. Mortality rates are based on previous experiments (e.g. [1]) and may be the result of unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage) and/or, in case of seizure-prone AD mice [2], prolonged seizing. We will start the experiment with 120 male mice and optionally also perform it with 120 more female mice. With this total number of mice we expect to ultimately, after MCAO-related mortality, end up with the required number of mice to obtain statistically relevant data in both sexes (n 14-15 per experimental group).

Life stages: The level of AD pathology, rather than aging, is leading in choosing the suitable life stage of the mice. For the experiment described in this appendix, we will induce mild experimental stroke in mature adult mice with AD pathology, as these mice have AD-associated impairments (representing advanced stage of AD), thus allowing us to monitor dietary effects on both AD- and stroke-related (cognitive) impairment.

1. Kemppainen, S., et al., *Behavioral and neuropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model mice*. Behav Brain Res, 2014. **275**: p. 15-26.

2. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------|
| mouse | 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen' | 240 | mature adult |

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: To study the complex interaction of both stroke and AD on brain structure and function and study the effect of diet on these parameters and cognition, it is not possible to use relatively simple animals or *in vitro* models. We have chosen mice as these animals are 1) the most commonly used to model the pathology of AD (i.e. amyloid deposition) and 2) they are, with rats, the only animals where MCAO is performed to experimentally induce stroke. Mice furthermore allow us to study stroke and AD-related behavioural and neurological deficits and the effect of diet on these parameters, parameters that cannot be studied *in vitro*.

Reduction: This experiment cannot be performed with less animals, as the chosen numbers have been carefully calculated to obtain statistically relevant results while taking a high expected mortality rate, as a result of the MCAO and the development of AD, into account. Furthermore, as previously mentioned, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. The experience gained from performing MCAO and neuroimaging in appendix 1 should also lower mortality rates in this experiment. The composition of the [REDACTED] diet will also be carefully chosen based on our previous experiences with these types of diets.

Refinement: There are currently no other techniques available to model ischemic stroke with less discomfort to the mice than the MCAO technique we will use. However, several measures will be taken to minimize pain and distress of the animals. For example, experimental stroke will be induced using standard operating methods and under general anesthetics. We will furthermore use a relatively non-invasive method of MCAO (e.g. no opening of the skull) and use occlusion tools that insure high reproducibility of the lesion size in different mice. To optimize the success rate, mild experimental stroke induction will furthermore be performed in close collaboration with expert researchers in the field. Neuroimaging experiments will also be performed under anaesthesia to minimize distress and the least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures to further minimize stress levels. Based on previous experiments, we do not expect any discomfort as a result of the [REDACTED] diet.

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

To minimize animal suffering, pain and fear the most distressing and painful procedures will be performed by experienced technicians/researchers. Furthermore, general anaesthesia and optimal post-surgery care, including analgesia, will be given. Only after a suitable recovery period will further animal procedures be performed. When possible, mice will be habituated to any tools or procedures that may be considered stressful to the animals, including certain behavioural setups (e.g. Pole test, Open field).

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable (not legally required)

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

After the occlusion, the animals will be individually housed to optimize healing of the surgical wound and better monitor physiological parameters and stroke-related abnormalities (e.g. abnormal motor function). As individual housing is also necessary to accurately measure consumption of the diet by each mouse, mice will not be group-housed after the recovery period (unlike appendix 1). Female mice in particular will experience discomfort as a result of the individual housing (severity: mild).

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

To relieve the pain associated with the surgery, analgesia will be given just before starting the surgery and, depending on the observed discomfort of the animals, up to 7 days after experimental stroke induction. To select proper analgesia, veterinarians and animal technicians will be consulted.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All mice will experience (mild) discomfort from stressors (e.g. handling, individual housing, motor and behavioral testing) associated with the different experiments outlined in section 2A (general design). Furthermore, despite proper post-operative care and the relative mild nature of the stroke induced, several adverse effects of the experimental stroke are to be expected. For example, stroke induction will result in neurological deficits, such as forelimb weakness and incessant circling to the affected side. In AD mice these neurological deficits may be more severe. Furthermore, modelling AD in mice often makes these animals more sensitive to (the aforementioned) stressors, resulting in side-effects such as seizures [1]. Inducing stroke in these models is expected to increase these adverse (stress-related) side-effects. These side-effects in turn are expected to increase mortality rates. Finally, adverse effects of the anaesthetics, e.g. isoflurane, may also be expected. These may include respiratory depression and a decrease in blood pressure.

1. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Explain why these effects may emerge.

Modelling AD in mice often results in increased sensitivity to stress due to the pathological accumulation of amyloid in the brains of these mice. Induction of experimental stroke can be considered stressful and will furthermore impair a part of the brain due to ischemia, thus resulting in neurological and/or behavioural deficits. Combining both pathologies in AD mice is expected to increase the vulnerability of these mice in particular.

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

To minimize (stress-related) adverse side-effects and mortality, we have chosen an MCAO technique that is relatively non-invasive (no opening of the skull). As a result of the experiments of appendix 1, we will be experienced in performing both MCAO and neuroimaging. Our extensive experience with AD mouse models should further minimize any stress resulting from for example housing conditions or handling. When possible, mice will be habituated to tools and procedures. During anaesthesia, heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. If any detrimental effects of anaesthesia are observed, the level of anaesthesia will be rapidly adjusted. When necessary, humane endpoint sacrifices will be performed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The animals will be prematurely euthanized if during MCAO surgery a decrease in regional cerebral blood flow (rCBF) of >80% of baseline is not reached (Note that a rCBF decrease of >80% during surgery is indicative of successful stroke induction). During the recovery period humane endpoints will be reached when 1) the animal stops eating or drinking, 2) body weight drops over 15% in two days or decreases >20% from its initial weight, 3) severe circulatory or breathing problems occur and/or 4) severe and persistent wound bleeding or infection occurs. Abnormal behavior and motor skills are to be expected, but if 35 days after MCAO surgery animals show only 50% motor activity, they will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

Estimated likely incidence of humane endpoints:

- Euthanization when rCBF reduction of >80% is not reached: 5%
- Euthanization during recovery period: 0-5%

Thus, 10% of the total expected mortality rates (35% in wild-types, 60% in AD mice) can be explained by humane endpoints, the remainder may be attributed to unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage; 25%) and/or AD pathology (25%).

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

During the experiment, the level of discomfort associated with inducing mild experimental stroke under anaesthesia with recovery can be classified as moderate. This procedure is imperative to the design of the study and therefore cannot be avoided. The individual behavioural and coordination tests can be considered mildly discomforting as is the neuroimaging paradigm (under anaesthesia). To assess general health, several mildly discomforting procedures (handling, weighing etc) will to be performed. Half of the mice will model AD by depositing amyloid protein in their brain, a pathology than gives these mice additional discomfort mainly due to the mild epileptic seizures that are associated with the stress-sensitivity of AD mice. The induction of mild stroke is expected to exacerbate the mild discomfort associated with AD pathology (expected in >50% of AD mice) by for example prolonging seizure duration and/or increasing the number of small seizures. Discomfort due to AD pathology in the stroke-induced AD mice is therefore expected to be moderate. Finally, the change of diet can be considered mildly discomforting (50% of mice).

Combining the above-mentioned discomfort levels and taking the duration of the experiment into account, we expect the overall level of discomfort to be classified as 'moderate' for all mice. The final neuroimaging paradigm will be non-recovery (terminal under anaesthesia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Immediately after the last neuroimaging paradigm, the mice will be sacrificed to study stroke lesion size, amyloid beta deposition and other relevant molecular markers (e.g. inflammation) in the brains of these mice.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0079
2. Titel van het project: Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease.
3. Titel van de NTS: De gevolgen van een herseninfarct op de ziekte van Alzheimer – een dieet interventie en hersenscan studie in muizen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 23-06-2015 en van 13-07-2015 tot 20-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 23-06-2015 en 20-07-2015
 - advies aan CCD: 27-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Project Proposal:**
 - -3.1 De onderzoekers classificeren hun projectaanvraag als translationeel onderzoek. De commissie is niet overtuigd van de validiteit van dit diermodel voor de humane situatie. De strokes bij Alzheimer patiënten zijn kennelijk dermate klein dat zij vaak onopgemerkt blijven, bij de Alzheimer muizen wordt een dermate groot infarct geïnduceerd dat 60% van de dieren

dit niet overleeft. Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom zij dit model relevant achten voor Alzheimer patiënten? Is er sprake van face, predictive, content of construct validity ?

- De commissie besluit eerst uw antwoord op deze vraag af te wachten alvorens zij de rest van de projectaanvraag nader bestudeert.
- Datum antwoord: 23-06-2015
- Strekking van het antwoord:
- Wij betreuren het dat onze aanvraag kennelijk niet duidelijk genoeg is geweest, waardoor de relevantie van ons diermodel niet gezien wordt. Wij hopen bij deze meer duidelijkheid te verschaffen op dit punt. Ten eerste erkennen wij dat de door ons geschatte 60% uitval bij de Alzheimer muizen met stroke inderdaad aanzienlijk is. Echter, zoals wij hebben aangegeven in beide appendices, onder andere bij punt B ('estimated numbers'), zal deze hoge mortaliteit bij de Alzheimer muizen in grote mate inherent zijn aan de gevoeligheid van deze muizen voor epileptische aanvallen (zie referentie 2 bij punt B). Wij schatten de uitval als gevolg van deze aanvallen op 25%. Daarbij schatten wij, op basis van onze eigen ervaring met deze techniek, de uitval als gevolg van de inductie van de stroke (door bijv. onverwachte bloedingen), ook op ongeveer 25%. Nog eens 10% van de uitval zal samenhangen met de humane eindpunten. Kortom, opgeteld verwachten wij met name bij de Alzheimer muizen een hoge uitval van 60% die echter niet één op één samenhangt met de grootte van het geïnduceerde infarct. Bovenstaande beschrijving van de door ons geschatte mortaliteitspercentages staat ook vermeld bij punt J ('likely incidence of humane endpoints') van de appendices.

Wat betreft de daadwerkelijke grootte van het door ons te induceren infarct, de experimental stroke die wij willen induceren wordt juist beschouwd als een milde stroke, gezien de korte duur van de occlusie. Gangbare tijdsduur van occlusie is 30 tot 120 minuten (zie referentie 13 in de project proposal), resulterend in modellen voor milde tot ernstige stroke. Wij willen in ons project een occlusie van hooguit 30 minuten toepassen, om zo het ongerief bij onze Alzheimer muizen te beperken en langdurige overleving te bevorderen. Kortom, onze muizen zullen een betrekkelijk klein, maar wel detecteerbaar, infarct krijgen. Om één en ander in de aanvraag te verduidelijken wat betreft ons model, hebben wij nu een korte beschrijving van stroke muismodellen toegevoegd aan punt 3.1 van de project proposal. Bij verwijzingen naar de experimental stroke bij de muizen geven wij nu bovendien aan dat dit een milde stroke betreft van maximaal 30 minuten (en dus niet meer 30-60 minuten, zoals vermeld in de oorspronkelijke aanvraag).

Hoewel bij de ziekte van Alzheimer (cerebro)vasculaire aandoeningen zoals microinfarcts of microbleeds ('small vessel disease') inderdaad een grote rol spelen, hebben wij nooit de indruk willen wekken dat alleen onopgemerkte infarcten een rol spelen bij stroke-gerelateerde Alzheimer. Bij deze vorm van dementie komen namelijk waarneembare infarcten ook zeker voor. Kortom, ook het milde infarct dat wordt geïnduceerd in ons model weerspiegelt wel degelijk een type infarct dat bij patiënten wordt waargenomen. Het is wat ons betreft dan ook zeker een geschikt model om de interactie tussen cerebrovasculaire ziekten en de ziekte van Alzheimer, een mengbeeld dat bij Alzheimer patiënten veelvuldig voorkomt, te onderzoeken. We hebben nu geprobeerd om de rol van waarneembare strokes duidelijker naar voren te laten komen in de aanvraag.

Graag willen wij hier nog benadrukken dat wij gebruik zullen maken van (een combinatie van) goed beschreven en alom gebruikte modellen voor zowel de ziekte van Alzheimer als

stroke. Zo is de occlusie van de middle cerebral artery, zoals wij die willen uitvoeren bij onze muizen, de meest gangbare methode om een model voor humane stroke te creëren. En, hoewel onze vraagstelling uniek is, zijn wij daarbij ook niet de eersten die stroke opwekken bij Alzheimer muizen (zie referenties 14-16 van de project proposal). Al met al menen wij dat er, gezien het feit dat ons model relevante etiologische en pathofysiologische aspecten van de humane condities nabootst, zeker sprake is van face en construct validity.

- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP 1 en 2, onderdeel B: Er is erg veel uitval van dieren, vooral bij de AD muizen. De onderzoekers schrijven dat dit in 25% van de dieren komt door epileptische aanvallen. Kunnen de onderzoekers aangeven wat het ongerief is dat gepaard gaat met de ernstige epileptische aanvallen? Welk percentage van de AD-dieren heeft epileptische aanvallen waar ze niet aan overlijden, en welke mate van ongerief ervaren deze dieren? In welke mate draagt de inductie van de stroke bij aan het optreden van aanvallen? De onderzoekers worden verzocht de inschatting van het ongerief voor de AD-muizen hier uitvoerig toe te lichten en te verwerken bij onderdeel K.
- Datum antwoord: 23-06-2015
- **Description of Animal Procedures, onderdeel B:**
- Zoals was vermeld bij onderdeel J van beide appendices, schatten wij de uitval als gevolg van de AD pathologie (A β depositie) bij de transgene muizen mét stroke inderdaad op 25%. Ook in de transgene muizen waar geen stroke wordt geïnduceerd verwachten wij uitval gerelateerd aan AD pathologie, maar deze schatten wij lager in, namelijk op 5-10%. Wij hebben nu dan ook in onderdeel J ('likely incidence') van appendix 1, waarin het gebruik van AD muizen zonder MCAO wordt beschreven, de uitval als gevolg van AD pathologie genuanceerd naar 5-25%. Wij verwachten hierbij inderdaad dat de AD-gerelateerde uitval in de transgene muizen met name het gevolg zal zijn van epileptische aanvallen. Deze aanvallen zijn een bekende bijkomstigheid van de accumulatie van A β in AD muismodellen (zie de referentie genoemd bij onderdeel I), waarbij het vermelden waard is dat ook bij de mens het risico op dergelijke aanvallen hoger is bij AD patiënten dan bij gezonde controles. Wat ons betreft draagt de aanwezigheid van epileptische aanvallen bij AD muizen dan ook bij aan de translationele waarde van het model.
Wat betreft het ongerief geassocieerd met de epileptische aanvallen bij AD muizen, is het onze ervaring dat de aanvallen over het algemeen zeer klein en kortdurend zijn (enkele seconden) en dat de muis hier niet of nauwelijks last van heeft. Wij zouden het ongerief van deze aanvallen in onbehandelde AD muizen dan ook als mild classificeren. Door blootstelling aan stressoren kan een aanval langdurig worden, wat het ongerief van de dieren verhoogt en de dood van de muis tot gevolg kan hebben. Wij verwachten dat dergelijke langdurige epileptische aanvallen meer zullen voorkomen in de AD muizen waarbij een stroke is geïnduceerd, wat maakt dat wij de uitval als gevolg van AD pathologie bij deze dieren zo'n 20% hoger inschatten en het ongerief van de epileptische aanvallen inschatten als 'moderate' in plaats van 'mild'. Deze toelichting is als gevraagd toegevoegd aan onderdeel K. Een inschatting geven van het percentage AD muizen dat een kortdurende of langdurige aanval krijgt, maar daar niet aan overlijdt, is lastig aangezien veel aanvallen onopgemerkt

zullen blijven. Eén en ander zal ook afhangen van het te gebruiken AD muismodel en de leeftijd van de muizen. Zo is onze ervaring met APPswe/PS1dE9 muizen dat zowel het aantal aanvallen als de uitval na een leeftijd van 5 maanden oud sterk afneemt, maar dit zal niet voor elk model gelden. Op basis van eerdere studies, waaronder de studie waarnaar wij refereren bij onderdeel I, verwachten wij dat, ongeacht het gekozen model of de leeftijd, bij >50% van de AD muizen een epileptische aanval kan plaatsvinden. Ook dit gegeven hebben wij toegevoegd aan onderdeel K van de appendices.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to study the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain to a) find novel (sex-specific) neuroimaging markers and/or predictors for mixed dementia and b) further elucidate (sex-specific) pathophysiological mechanisms linking stroke and AD' en 'investigate the effect of a [REDACTED] [REDACTED] diet on stroke- and AD-related cognition and brain network integrity'. Wetenschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat het meer inzicht kan verschaffen in de implicaties van een herseninfarct voor hersenstructuur en -functie, cognitie en gedrag voor beide sexen in een muizenmodel voor de ziekte van Alzheimer. Voorts wordt duidelijk of een [REDACTED] [REDACTED] dieet het verloop van de ziekte – al dan niet in combinatie met een herseninfarct - kan beïnvloeden. Dit onderzoek is ook maatschappelijk van belang, omdat de resultaten op termijn kunnen leiden tot de ontwikkeling van (sex-specifieke) diagnostiek en/of geïndividualiseerde therapie voor mensen met de ziekte van Alzheimer. De ziekte van Alzheimer is een invaliderende ziekte met een toenemende prevalentie in de bevolking. Betere behandelingen zouden resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen, en in kostenreductie door het terugdringen van invaliditeit. De realisatie van de genoemde doelstellingen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC daarom een substantieel belang.
4. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC heeft uitvoerig stilgestaan bij de vraag of de gebruikte methode voor het aanbrengen van

herseneninfarcten bij de muizen een realistisch model is voor de herseneninfarcten die optreden bij Alzheimer patiënten, en waarvan verondersteld wordt dat ze bijdragen aan het ziektebeeld. De DEC is tot de overtuiging gekomen dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot betrouwbare uitspraken over het effect van een herseneninfarct bij muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer en de mogelijke therapeutische werking van een multi-nutriënten dieet.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het induceren van een herseneninfarct, en de gevolgen daarvan voor de dieren in de daarop volgende maanden. De combinatie met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer verergert dit ongerief. De commissie heeft extra aandacht besteed aan het achterhalen van het werkelijke ongerief voor de muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer en de invloed van die genetische aanleg op de impact van een herseneninfarct, om er zeker van te zijn dat dit onderzoek ethisch verantwoord is. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde operatie in als matig. Het ongerief als gevolg van de gedragstesten en het imageren schat de commissie in als licht. Het ongerief voor de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer die na het herseneninfarct gedurende lange tijd (6 tot 8 maanden) in het experiment blijven, schat de commissie in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is daarom terecht ingeschat als matig voor 80% van de dieren, en ernstig voor 20% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Om het effect van herseneninfarcten op cognitie en gedrag te kunnen meten zijn proefdieren nodig die een voldoende complex gedragsrepertoire hebben.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De uitval, met name onder de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer waarbij een herseneninfarct wordt aangebracht, is in de loop van het experiment vrij hoog. Het betreft een lastige ingreep die niet altijd lukt. Ook is het van belang om in het traject na de ingreep strikte humane eindpunten te hanteren en dieren met complicaties op tijd uit de proef te nemen. Voor het grootste deel gaat het bij de dieren die uitvallen niet om dieren met ernstig ongerief. Het uitvalpercentage is gebruikelijk voor dit type model en is niet te wijten aan een gebrek aan technische vaardigheid van de onderzoekers. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren, waarbij rekening wordt gehouden met die uitval. Door de resultaten van de dieetinterventie bij mannelijke dieren af te wachten alvorens dit bij vrouwelijke dieren wordt bepaald, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 470 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Het

herseneninfarct wordt op een naar verhouding weinig-invasieve manier en gedurende een zo kort mogelijke tijd aangebracht. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de implicaties van een herseneninfarct voor hersenstructuur en –functie, cognitie en gedrag voor beide sexen bij een muizenmodel voor de ziekte van Alzheimer. Voorts wordt duidelijk of een multi-nutrienten dieet het verloop van de ziekte – al dan niet in combinatie met een herseneninfarct - kan beïnvloeden. Het is aannemelijk dat dit onderzoek op termijn kan bijdragen aan het ontwikkelen van betere diagnostiek en therapie voor mensen met de Ziekte van Alzheimer. Het belang van de genoemde wetenschappelijke inzichten in de rol van herseneninfarcten bij de Ziekte van Alzheimer en van betere diagnostiek en geïndividualiseerde therapie voor mensen met deze ziekte acht de DEC substantieel, mede gezien de toenemende prevalentie van deze invaliderende ziekte.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt zullen worden matig ongerief ondervinden als gevolg van het herseneninfarct. Voor de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer die gedurende lange tijd gevolgd zullen worden (20% van de dieren) leidt dit tot ernstig ongerief. De commissie heeft extra aandacht besteed aan het achterhalen van het werkelijke ongerief voor de muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer, om er zeker van te zijn dat dit onderzoek ethisch verantwoord is. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren. De experimenten komen qua design overeen met wat in het onderzoeksveld gebruikelijk is.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - o 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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Centrale Commissie Dierproeven

7

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboudumc
[REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015234

Datum: 01-09-2015

Factuurdatum: 1 september 2015
Vervaldatum: 1 oktober 2015
Factuurnummer: 201570234
040823-461220
2015-0079
[REDACTED]

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015234 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015234

Bijlagen

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015234. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: UHD
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 28 september 2015
Geplande einddatum: 28 september 2020
Titel project: Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer
Titel niet-technische samenvatting: De gevolgen van een herseninfarct op de ziekte van Alzheimer een dieet interventie en
Naam DEC: RU Dec
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 31 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015234

Bijlagen

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 september 2015

Vervaldatum: 1 oktober 2015

Factuurnummer: 201570234

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015234 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015234

26 SEP. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" met aanvraagnummer AVD103002015234. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 september 2015 tot en met 27 september 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning voor maximaal 5 jaar kan worden afgegeven. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU Dec gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op


<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 september 2015 tot en met 27 september 2020, voor het project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" met aanvraagnummer AVD103002015234, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU Dec.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale Indiening op 31 augustus 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 augustus 2015, ontvangen op 31 augustus 2015.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|------------------|-------------|
| Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters | Muizen (Mus musculus) / wildtype en AD muizen | 230 | Ernstig / severe | |
| Acute effects of multi-nutrient diet on mixed dementia parameters | Muizen (Mus musculus) / wildtype en AD muizen | 240 | Matig / moderate | |

Voorwaarden**Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen**

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving 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 voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 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 worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2020 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de

doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 8 oktober 2015 10:59
Aan: [REDACTED]
CC: Info-zbo
Onderwerp: Terugkoppeling aanvraag AVD103002015234

Beste DEC,
Onlangs heeft u een advies uitgebracht aan de CCD betreffende aanvraag AVD103002015234, getiteld: "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease".

Namens de CCD bedank ik u voor dit heldere, goed onderbouwde advies. De CCD heeft uw advies gevolgd. Het project is vergund. De CCD heeft echter nog 2 algemene voorwaarden toegevoegd.

- 1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.
- 2) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Deze e-mail is enkel bedoeld ter informatie.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.