

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20172885	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier oud				x		x		
2	Projectvoorstel oud				x		x		
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek en reactie aanvulling				x		x		
8	Aanvraagformulier nieuw				x		x		
9	Projectvoorstel nieuw				x		x		
10	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw			x					
12	Adviesnota CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

09 AUG. 2017



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of 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>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Universiteit Maastricht</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>50169181</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Minderbroedersberg 4-6</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>616</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6200 MD MAASTRICHT</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL04 INGB 0679 5101 68</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Maastricht</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	50169181	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6	Postbus	616	Postcode en plaats	6200 MD MAASTRICHT	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																	
KvK-nummer	50169181																	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6																	
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD MAASTRICHT																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
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>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="6">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> <tr> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres										
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]																	
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>☐ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres							
(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.																	
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters | | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- ☒ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- ☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- ☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- ☐ Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- ☐ Nee > Ga verder met vraag 3
- ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 9 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 9 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de Instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC UM |
| Postadres | POSTBUS 616
6200 MD MAASTRICHT |
| E-mailadres | secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 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
- ☒

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 1.7). 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

Datum

Handtekening





Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. MAASTRICHT UNIVERSITY
- 1.3 Provide the title of the project. Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Carotid artery stenosis, as a result of hypertension, dyslipidemia, diabetes as well as ageing, interferes with the cerebral autoregulation and leads to cerebral hypoperfusion. This is considered as a major trigger for the development of vascular cognitive impairment (VCI)¹. Following the induction of

carotid artery stenosis in mice, their cognitive function is selectively impaired over time (working memory altered first, followed by impairment of short/long-term memories at a chronic timepoint)^{2,3}. However the different key players involved in this pathological cascade and their involvement in a time-dependent manner remain elusive. We showed that microglia cells are involved in the pathological cascade of hypertension-induced VCI⁴. Indeed, leakages of the blood brain barrier (BBB), due to the elevated blood pressure, are associated with an increased density and activation of microglia.

Microglia are the resident immune cells of the brain and protect it from neurodegeneration. Brain injury, including cerebrovascular injuries⁵, leads to morphological changes, migration and proliferation of microglial cells at the site of injury. In addition to the phagocytosis of dead cells and debris, activated microglia also release cytokines to maintain local homeostasis, and therefore protect neuronal function. This protective phenotype is believed to take place in an acute manner. However upon exposure to chronic pathological conditions, microglial activation is associated with neurotoxic functions and the emergence of an aberrant inflammatory response (increased synthesis of cytokines: a.o. IL-1 β , TNF- α , IL-6⁶) a phenomenon leading to neurodegeneration⁷.

Although their ability to activate upon hypoxic conditions has been proven in vitro⁸, there is no direct in vivo evidence linking tissue hypoperfusion to microglial activation. Furthermore the subsequent consequences of microglial activation on cerebrovascular (BBB) and neuronal integrities is unknown. It is therefore of utmost importance to study their activity in vivo over time (upon acute and chronic hypoperfusion).

In addition to microglia, other immune cells may play a role in Vascular Cognitive Impairment pathologies following BBB injury. The contribution of other immune cells in this pathological condition will be studied in case findings regarding the impact of microglia in this pathology is limited.

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?

Overall objective:

The aim of the present study is to decipher the pathological cascade associated with cerebral hypoperfusion. In particular the present project will investigate the role of microglia cells on the vascular and neuronal compartments during cerebral hypoperfusion.

Aim 1: Pathological cascade of cerebral hypoperfusion

Determine if acute and chronic cerebral hypoperfusion are associated with Blood Brain Barrier leakages, microglial activation, neurodegeneration and cognitive impairment.

Aim 2: Modulation of microglial activity/presence during cerebral hypoperfusion

Determine if microglia cells exhibit a protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion by modulating their function and/or density in the brain.

Achievability:

This research project is achievable within a reasonable time frame (3 years) and with a limited number of animals. Most of the techniques, including the thinned skull cranial window, required to perform this project are already present within the research group. The involved researchers have a long-standing experience with the main procedures described in this project: carotid surgery, cerebral blood flow measurement, cranial window, in vivo imaging, behavioural tasks and animal perfusion. In addition, the implementation of BCAS surgery, which is a similar surgery that one already mastered on site (placement of a carotid cuff), will be taught by external researchers experts in this technique (national collaboration).

3.3 Relevance

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

Cognitive impairment and dementia, are major disabilities increasing due to population ageing. The World Health Organization estimates that 35 million people live with dementia and expects this number to triple by 2050⁹. Major progresses in the last decade have revealed the contribution of vascular dysfunction to cognitive impairment¹⁰, but the extent of this contribution to all cognitive impairment/dementia cases is still unclear as tools/biomarkers to detect small vessel disease pathology in the brain have been only validated recently. Vascular Cognitive Impairment (VCI) encompasses all the cognitive disorders associated with cerebrovascular disease, from frank dementia to mild cognitive deficits¹. The present project is therefore of major importance to improve our understanding of the pathology and to identify potential therapeutic target to limit/delay its progression.

3.4 Research strategy

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

3.4.1 – Project design

Project description

Animals and surgery

Transgenic reporter mice expressing Green Fluorescent Protein (GFP) in microglia (Cx3Cr1-GFP) and Yellow Fluorescent Protein (YFP) in neurons (Thy1-YFP) will undergo a thinned-skull cranial window surgery followed by a Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS) procedure to induce cerebral hypoperfusion (or sham operation)^{11,3}. Two-photon imaging of the cerebral cortex through the thinned-skull cranial window will allow the study over time of the vascular, microglial and neuronal compartments.

Cerebral blood flow, in vivo imaging and cognitive function (Aim 1 & 2)

At all timepoints, the cerebral blood flow will be measured using a trans-cranial laser Doppler flowmeter. In vivo imaging (via the cranial window) will be performed before the BCAS surgery, few days after (acute timepoint) and up to one month after the surgery (chronic timepoint), in order to assess the activity/phenotype of microglia over time. The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery (acute and chronic). Investigations of the cognitive function at both (acute and chronic) timepoints is needed as it has been suggested that working and short-term memories may be impaired at an earlier timepoint than long-term/reference memory in this model³. Working memory will be assessed with the use of a Y-maze alternation task, short-term and long-term memory with an Object Location task and spatial learning and long-term memory with the Barnes maze task. Brains from sham and BCAS reporter mice will be harvested for further investigations of microglial phenotype by flow cytometry and for 3D histology¹².

Treatment (Aim 2)

A pharmacological intervention to modulate the activation of microglia or to decrease their density will be performed in sham and BCAS mice. Targeting microglia in BCAS animals will allow us to decipher their protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion. One possible approach (amongst others) to investigate the role of microglia is to use a therapeutic intervention to deplete the microglial population via inhibiting CSF1 receptor signaling. This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals^{13,14}. The definite treatment choice will be made at the end of other ongoing animal studies (not the proposed project) in which safety and efficacy will be assessed. The choice will be made during the preparation of the work protocol.

Experimental design

1) Pilot study

A pilot study will be performed to implement the BCAS surgery and to validate the readouts for in vivo imaging in this animal model before the study of the experimental groups.

A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be tested in combination with the cranial window surgery.

In this pilot study both Sham and BCAS groups are required.

The Sham group is of importance for the pilot study for the following reasons:

- Statistical validation of the decrease of the cerebral blood flow (laser Doppler). Sham and BCAS groups should be balanced (similar n) for a proper validation;

- the pilot study is not only required to learn the BCAS surgery but also to assess its feasibility in combination with the cranial window surgery and imaging. It is of major importance to demonstrate the BBB integrity in the Sham animals over time to be able to assess the BBB dysfunction in the BCAS mice.

The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :

- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that corresponds to the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

20 mice per group (Sham/BCAS) are planned for the pilot study. However as soon as the threshold of 10 successful experiments (BCAS + cranial window + imaging) will be reached per group (with the above-mentioned criteria), no additional animals will be used for the pilot project and the study of the experimental groups will be initiated.

2) Acute and chronic BCAS to evaluate the pathological cascade and effects of microglia modulation as defined in aims 1 and 2

A phased design between the acute and chronic timepoints is not possible within this project. Indeed, while acute hypoperfusion can lead to a decline in the working memory, short and long-term memory impairment can only be detected after a longer exposure to hypoxic conditions^{3,2}. It is therefore mandatory to study both timepoints as the brain areas targeted by acute and chronic hypoperfusion can differ (in relation to the type of memory dysfunction). In addition, it is known that microglial behaviour can differ between acute and chronic stimuli, harbouring respectively either a protective or a deleterious phenotype. Their study over time is therefore also required.

The different steps of the project and their logical sequence are shown in **Figure 1** (below, **next page**).

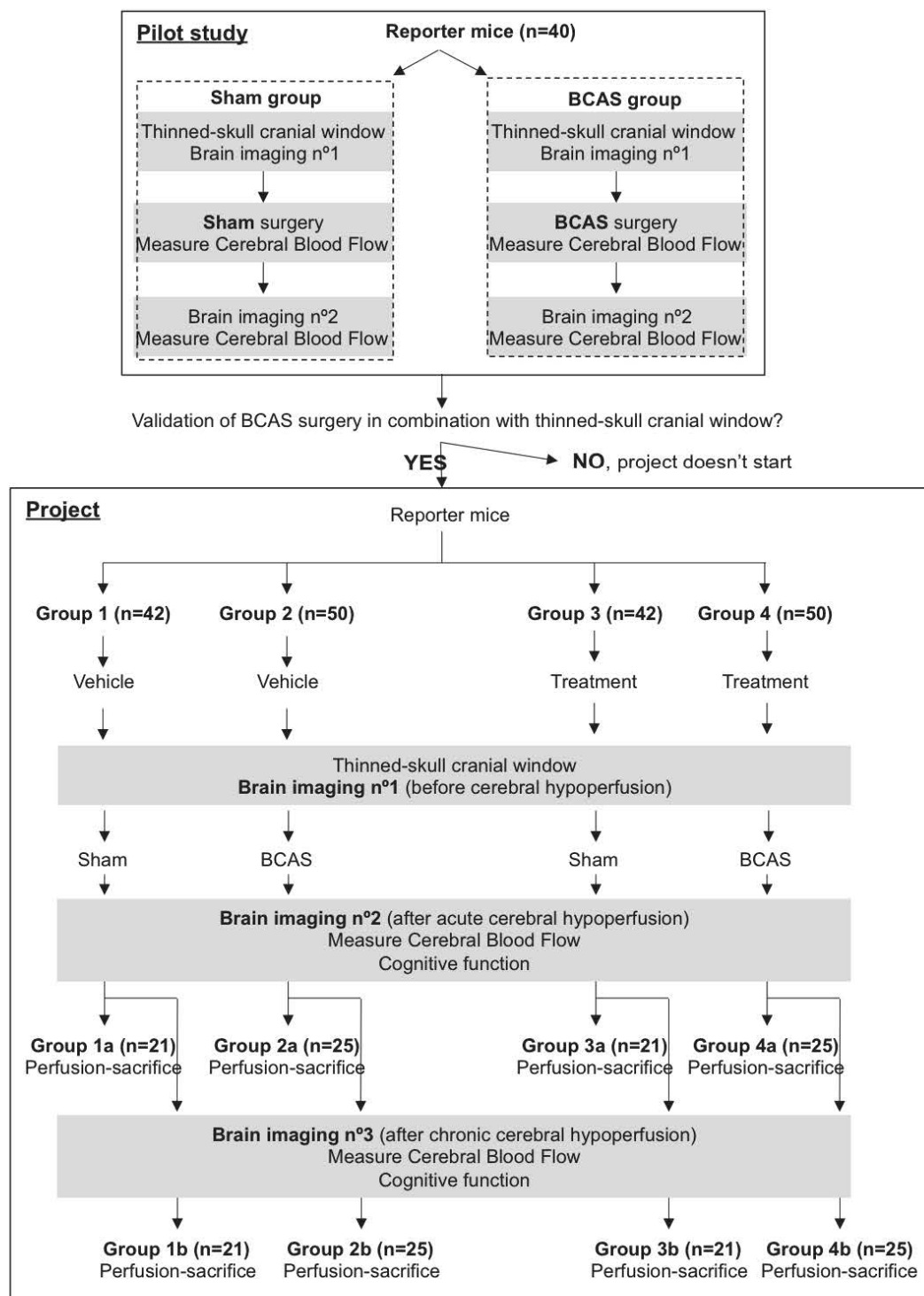


Figure 1: Overall design of the project

References:

1. Iadecola, C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* **80**, 844–866 (2013).
2. Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38**, 2826–2832 (2007).
3. Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41**, 1278–1284 (2010).

5. Nishimura, N. & Schaffer, C. B. Big effects from tiny vessels: imaging the impact of microvascular clots and hemorrhages on the brain. *Stroke* **44**, S90–92 (2013).
6. Perry, V. H. & Holmes, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **10**, 217–224 (2014).
7. Luo, X.-G., Ding, J.-Q. & Chen, S.-D. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **5**, 12 (2010).
8. Li, F. *et al.* Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* **12**, 111 (2011).
9. World Health Organization & Alzheimer's Disease International. *WHO | Dementia: a public health priority.* (2012).
10. Gorelick, P. B. *et al.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* **42**, 2672–2713 (2011).
11. Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35**, 2598–2603 (2004).
12. Pan, C. *et al.* Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* **13**, 859–867 (2016).
13. Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82**, 380–397 (2014).
14. Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12**, 139 (2015).
15. Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34**, 319–337 (2013).

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.

3.4.2 – Procedures

Listing of the procedures:

- Handling and weighting the animals;
- Sham or BCAS surgery;
- vehicle or drug treatment;
- cerebral blood flow measurements using a laser-doppler flowmeter;
- thinned skull cranial window;
- in vivo 2-photon imaging;
- behavioural tasks (Y-maze alternation task, Object Location task, Barnes Maze test);
- perfusion +/- fixation for histology and flow cytometry.

In vivo/Ex vivo imaging:

The thinned skull cranial window performed on transgenic reporter mice that will express fluorescent probes in microglia and neurons (Cx3Cr1-GFP x Thy1-YFP) will allow the study of the vascular, microglial and neuronal compartments over time as follow:

- The cortical vasculature will be visualized after the injection of a chemical dye which should not leaked from the lumen to the brain parenchyma due to its size. The presence of the dye outside of the vasculature will indicate a dysfunction of the blood brain barrier. Leakages will be imaged and quantified;
- Microglia behaviour: density and morphology such as cell volume, length of microglial processes, distance from vessel/leakage;
- Neuronal integrity: axonal degeneration.

Ex vivo imaging of the isolated brains will allow further investigations within the whole brains using 3D histology (acute and chronic timepoints).

Behavioural tasks:

A set of behavioural tasks will be performed after the sham/BCAS surgeries (acute and chronic timepoints):

- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task¹⁵;
- short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location

Task¹⁵;

- Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test³ (only chronic timepoint).

Sacrifice:

Sham and BCAS mice will be sacrificed at both acute and chronic timepoints for brain extraction, microglia isolation and flow cytometry work. Using microglial/macrophage specific markers, the phenotype of microglia cells will be characterized and compared between groups.

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.

3.4.3 Planning – coherence

The steps of the project are shown in Figure 1.

- The first cranial window in vivo imaging session will be done before the induction of hypoperfusion or sham procedures in order to collect baseline data for later comparison with the next timepoints;
- The treatment (or vehicle) to interfere with microglial function/presence will be performed before the induction of hypoperfusion as well to be able to understand the impact of microglia at both acute and chronic timepoints of hypoperfusion;
- The cerebral blood flow (laser Doppler) will be assessed at the baseline before induction of hypoperfusion, right after the surgery to guarantee the efficiency of the surgical procedure, and at each timepoint of the study:
- Acute timepoint: few days after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;
- Chronic timepoint: approximately 1 month after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;

Coherence

After induction of cerebral hypoperfusion, the integrity of the BBB is expected to be altered, leading to leakages of blood components/cells to brain parenchyma. Subsequently microglia will become activated to phagocyte the components that invade the brain. This acute hypoperfusion combined with acute microglial activation is expected to have a limited impact (as for amplitude and localization) on neuronal viability/function, with a cognitive dysfunction limited to working memory. However, following a chronic hypoperfusion, the BBB damage is expected to be more extended and associated with a deleterious microglial phenotype with exaggerated pro-inflammatory actions. As a consequence, neuronal injuries may take place in multiple cognitive domains leading to subsequent deficits in short and long-term memory tasks. By modulating microglial density and/or activity in the treated groups, the pro-inflammatory profile due to microglia is expected to decrease, affording therefore neuroprotection and a maintained cognitive function in this disease model.

Although cranial window imaging technique offers temporal resolution, it is limited to cortical areas. Therefore immunohistochemistry studies at both acute and chronic timepoints will be performed on whole brains to further investigate the brain pathological changes in deeper areas. Furthermore flow cytometry of brain tissues will offer complementary phenotypic informations (markers of activation) on microglial populations at both timepoints.

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	Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie
1.2 Looptijd van het project	3 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Dementie; cerebrale hypoxie; carotisstenose; neuro-inflammatie; in vivo beeldvorming

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	☒ Fundamenteel onderzoek
	☐ Translationeel of toegepast onderzoek
	☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	☐ Hoger onderwijs of opleiding
	☐ Forensisch onderzoek
	☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Risicofactoren voor hart- en vaatziekten (zoals hoge bloeddruk, diabetes, verhoogd cholesterol) en veroudering kunnen leiden tot een afname van de diameter van de carotis, het bloedvat dat verantwoordelijk is voor de toevoer van zuurstofrijk bloed naar de hersenen. Het kleiner worden van de carotis wordt een carotisstenose genoemd en wordt geassocieerd met een verminderde bloedstroom in de hersenen, geheugenverlies en dementie. Geheugenverlies en dementie zijn grote beperkingen die vaker voorkomen door veroudering van de bevolking. Er is (nog) geen adequate behandeling voorhanden. Het is daarom van groot belang om het onderliggende ziektemechanisme beter te begrijpen. De rol die microglia-cellen, de immuuncellen van de hersenen, hierbij spelen is nog onbekend. Er is bij
---	--

eerdere studies bewijs gevonden dat deze cellen beschadigd raken wanneer ze blootgesteld worden aan te weinig zuurstof. Daarom zal dit project de rol van microgliacellen bij een carotisstenose onderzoeken.

- | | | |
|-----|---|--|
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | We verwachten te bepalen of microgliacellen een beschermende of een schadelijke invloed hebben op de bloedvaten en zenuwcellen in de hersenen bij een verminderde bloedtoevoer naar de hersenen. Verdere kennis over de rol van microgliacellen in deze ziekte zullen leiden tot nieuwe studies die de werking van microgliacellen zullen remmen danwel bevorderen. Vanuit dit project kunnen hopelijk toekomstige behandelmogelijkheden ontstaan die zich richten op microgliacellen. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Voor de studie worden maximaal 224 muizen gebruikt over een periode van 3 jaar. |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | In dit project wordt gebruikt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren. Deze dieren heb een verandering in de genen ondergaan waardoor er fluorescentie tot uiting komt in de cellen van interesse. We hebben deze muizen in eerdere studies onderzocht en er wordt geen ongerief verwacht ten aanzien van dit fluorescentie kenmerk.
De muizen in de studie zullen operaties ondergaan. Deze operaties worden uitgevoerd onder anesthesie waardoor er geen directe negatieve effecten worden verwacht door de operatie. De consequenties van de operaties zullen echter leiden tot ongerief voor de geopereerde muis door verminderde bloedtoevoer naar de hersenen. Dit gaat gepaard met gewichtsverlies en stoornissen in het geheugen, zoals verwacht bij het ontwikkelen van de ziekte. Eén deel van de dieren zal ook behandeld worden met een geneesmiddel om het aantal microgliacellen te verminderen terwijl de andere groepen een placebo behandeling krijgen. Het geneesmiddel wordt op dit moment getest in mensen en is eerder al getest in verschillende dierstudies waarbij er geen ongerief voor de dieren wordt gerapporteerd. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | De operaties worden ingedeeld in de categorie "matig ongerief ". De gevolgen van de operaties worden ingedeeld in de categorie "matig ongerief". |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Euthanasie |

4 Drie V's

- | | | |
|-----|--|--|
| 4.1 | Vervanging
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet | Onze studie is gericht op de interactie tussen verschillende cellen bij verminderde bloedtoevoer naar de hersenen en de invloed van het toedienen van een geneesmiddel tijdens de ontwikkeling van een ziekte. Er is geen alternatieve methode voor deze studie. Daarnaast worden ook de geheugenfuncties geëvalueerd om het potentiële effect van de behandeling te beoordelen. |
|-----|--|--|

gebruikt kunnen worden.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Hetzelfde dier wordt gebruikt voor het onderzoeken van verschillende parameters tijdens dit project. Er worden immers een aantal experimenten uitgevoerd op hetzelfde dier: geheugen taken, beeldvorming, bloedafname en analyse van de hersencellen. Het aantal dieren nodig per groep wordt berekend op basis van eerdere studies en bestaande publicaties om te garanderen dat **het juiste aantal dieren (niet te veel, niet te weinig) wordt gebruikt.**

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De muizen die we gaan gebruiken in dit onderzoek zijn transgene dieren die een fluorescerend eiwit in de cellen van interesse hebben. Dit maakt het mogelijk de cellen in levende muizen te volgen en dit geeft meer informatie dan de standaard beeldvormende technieken. De muizen ondergaan een **erkende** chirurgische ingreep die verminderde bloedtoevoer naar de hersenen veroorzaakt. Dit is een erkend model in dit onderzoeksveld. De combinatie van deze chirurgische operatie en de transgene muis is een perfecte combinatie voor het bereiken van de doelen van het voorgestelde onderzoek.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De kans op lijden of pijn wordt tot een minimum beperkt door een combinatie van verdoving, pijnbestrijding, optimale huisvesting, termineren van dieren in aparte ruimten en het **wekelijks** inspecteren van het welzijn van de dieren.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. MAASTRICHT UNIVERSITY
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

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.

The type and sequence of the animal procedures is summarized in the figure 1 and listed below. Ten animal groups will undergo these procedures (Pilot Sham, Pilot BCAS, group 1a, group 1b, group 2a, group 2b, group 3a, group 3b, group 4a, group 4b):

Groups	Pilot		1 (a&b)	2 (a&b)	3 (a&b)	4 (a&b)
Goal	Optimization		Experimental groups			
Surgery	Sham	BCAS	Sham	BCAS	Sham	BCAS
Treatment	No		Vehicle	Vehicle	Treatment	Treatment
Timepoints	Acute & chronic		Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)

Only male mice will be studied as sex differences have been reported for microglial activation¹⁻³ but also cognitive impairment disorders⁴. Sex-specific differences in gene expression have been observed in resting microglia that may lead to a differential response upon exposure to a trigger. This has been confirmed in studies showing a differential microglial activation during stress and hypoxic conditions¹⁻³. It is therefore very likely that the microglial response to BCAS may differ between genders. Because the inclusion of both genders may increase the variability, thus decrease the statistical power and limit the interpretation of the data, only male mice will be included in this study.

List of animal procedures:

Drug treatment

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The reporter mice will be treated with a drug either to deplete microglia cells or to decrease their activation. One possible therapeutic intervention is the depletion of microglial population via inhibiting CSF1 receptors (e.g. PLX5622). This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals^{5,6}. The dose of the treatment will be selected based on published animal studies that have shown evidences for its efficiency and its toxicological safety. It will be administered throughout the whole study period (in food pellets or drinking water) to investigate the contribution of microglia cells to hypoperfusion-induced vascular dementia.

Cranial window surgery and imaging

The reporter mice will undergo a thinned-skull cranial window surgery.

This minimally invasive procedure consists of the thinning of the skull in a small area to allow the visualization of vessels, microglia and neurons below the skull surface, without opening of the cranial box thanks to two-photon microscopy.

This technique will allow the chronic imaging of:

- the cerebrovascular permeability (permeability to injected fluorescent probes);
- the microglial behaviour (density, cell volume, location);
- the neuronal integrity (axonal integrity of cortical neurons).

In vivo brain imaging sessions will be performed before the induction of cerebral hypoperfusion, soon after the induction of hypoperfusion (1-3 days) and after a longer period (c.a. 4-5 weeks). This will give new insights into the pathology development over time.

Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS)

This well-established procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced with 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm^{7,8}.

Cerebral Blood Flow (CBF) measurements

The efficacy of the BCAS procedure will be assessed by the measurement of the CBF before the narrowing of the CCAs, right after the surgical procedure as well as at several time points throughout the studies to follow the severity of the hypoperfusion in each individual animal. CBF measurements will be achieved by using a trans-cranial laser Doppler flowmeter. The laser-doppler probe will be glued on the skull surface for a short time period allowing recording of the CBF.

Cognitive evaluation

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery at both acute and chronic timepoints.

- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task⁹;
 - short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location Task⁹;
 - Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test⁸ (only chronic timepoint).
- Hypoperfused animals show an impaired working memory after cerebral hypoperfusion for 1 month while reference memory is only impaired after cerebral hypoperfusion for 5-6 months^{7,8}. The protective or deleterious contribution of microglia cells on the cognitive functions of the animals will be determined in the treated groups.

Perfusion and sacrifice

Treated and non-treated sham/BCAS animals will be perfused and euthanized for the collection of brains that will serve for ex vivo investigations (2D and 3D histology, flow cytometry for the characterization of microglia phenotypes). While in vivo imaging limits the imaging to the first cortical layers of the brain, ex vivo imaging of the whole brains will provide more informations on the impact of cerebral hypoperfusion in deeper areas.

A first series of animals will be perfused and sacrificed at an early timepoint after induction of cerebral hypoperfusion. A second series of animals - imaged in vivo at both acute and chronic timepoints - will be perfused and sacrificed at the late timepoint after in vivo imaging. During the perfusion step, several fluorescent dyes will be injected to assess the integrity of the blood brain barrier.

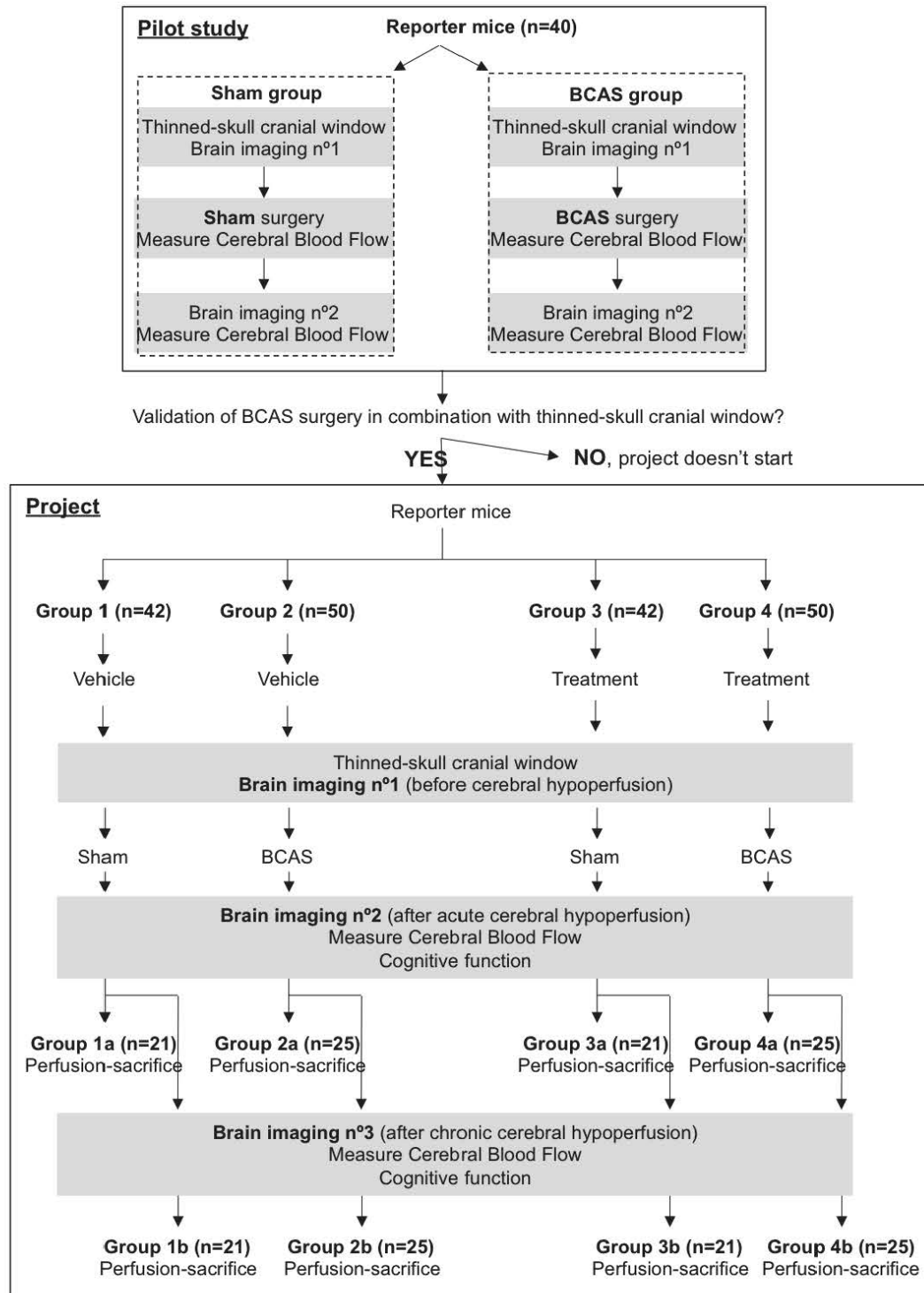


Figure 1: General design of the experimental procedures

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

Total duration

Maximal experiment duration for one animal (chronic hypoperfusion situation): 6 weeks (one week with cranial window prior BCAS surgery, maximum 5 weeks after BCAS surgery).

Animal procedures

All the animal procedures with their respective natures and frequencies are listed in the table below. A short description of the main procedures is described in the table below

Procedure	Nature	Frequency	Justification
Body weight measurement and neurological scoring	Animal handling	1x/week	Animal welfare score sheet and humane endpoint
Drug treatment (see corresponding paragraph, e.g. CSF1R inhibitor ^{5,6})	Administration of a drug (food or water)	daily	Study the potential protection afforded by the drug
Thinned skull cranial window and TPLSM imaging (see description below the table)	Surgery Imaging	1x 4x	In vivo imaging to study the impact of cerebral hypoperfusion on vascular, microglial and neuronal compartments over time ¹⁰
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)	Surgery	1x	Induction of the pathology (cerebral hypoperfusion) ^{7,8}
Brain Laser Doppler flowmetry	Imaging	4 x	Assessment of the decrease of cerebral blood flow induced by the BCAS intervention, after surgery and prior to each imaging session. ⁷
Y-maze alternation task	Behavioral task	2 x	Assessment of working memory ^{9,11}
Object Location Task	Behavioral task	2 x 3 trials	Assessment of short and long term spatial memories ^{9,11}
Barnes Maze test	Behavioral task	4 trials x 5 days	Barnes Maze test ⁸
Perfusion and sacrifice	Terminal experimentation	1x	Collection of fixed and non-fixed brains for IHC and flow cytometry respectively

Thinned skull cranial window:

Transcranial two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) imaging of the cortex in living mice is a minimally invasive method, which allows repeated imaging of brain cells and vasculature at high optical resolution over intervals ranging from seconds to months. By creating a thinned-skull cranial window with skull thickness ~20 µm, it is possible to image fluorescently labelled structures located up to 300µm within the cortex using TPLSM. In the past several years, this transcranial imaging approach has been used to study the development and plasticity of synaptic connections, neuronal network activity, cerebral vasculature, amyloid plaques and the structure and function of microglial cells in the living intact cortex ^{10,12,13}. This is the most suitable technique for chronic in vivo imaging at a high resolution.

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)

Under surgical anaesthesia, a midline cervical incision will be performed. Both CCAs will be exposed and freed from their sheaths. The arteries will be gently lifted by sutures and placed between the loops of the microcoils just below the carotid bifurcation. The microcoils will be twined by rotating it around the CCAs. In the sham operation groups, CCAs will be exposed without placing microcoils. This technique has been proven to be effective to induce a moderate reduction of CBF (-30%) with a mortality of 15-20% and a cognitive dysfunction in the operated mice^{7,8,14,15}.

Y-maze alternation task

Each mouse will be placed in a randomly divided start arm of a Y-maze and allowed to freely explore the arena for 6 min. The number of arm entries and the locomotor activity will be recorded per mouse. A successful alternation, named « a triad », is made if the mouse visits all 3 arms of the maze consecutively. The alternation percentage will be calculated from the number of triads divided by the maximum possible alternations per mouse. This is a standard behavioural task to assess the working memory of rodents.

Object Location Task (OLT)

Short and long-term spatial memory will be tested using the OLT. Briefly, this 2-trial task consists of a learning (T1) and -test trial (T2). In T1 a set of two identical objects will be placed symmetrically in the middle of a circular arena, which can be freely explored for 4 minutes. After a short or long interval period spent in their home cage, the mice will be placed in the arena 4 minutes for T2, while one of the objects (right or left) will be moved to a different location (front or back) and all other stimuli will be kept the same. As rodents are naturally curious, they should spend more time exploring the moved object if they remember the previous location. The time spent exploring either object will be scored. Before the testing session, animals will be habituated to the empty arena, all objects and testing procedures for a period of 1 week. This is a standard behavioural task for the evaluation of both short and long-term spatial memories.

Barnes Maze test

This behavioral task assess the spatial learning and reference memory of the tested mice. It is based on the capabilities of mice to explore and escape through holes. Barnes maze consisted of a circular surface with many holes around the perimeter. An escape tunnel is located beneath one of the holes. After habituation to the experimental setup, mice will be trained to locate a hidden escape tunnel with the aid of visual cues. Mice will perform 4 trials per day for 5 consecutive days. The Barnes maze is similar to the Morris water navigation task, but does not utilize a strong aversive stimulus as reinforcement (stress induced by swimming). Since high levels of stress can influence the animal's performance, the Barnes maze is considered ideal for eliminating stress-induced confounds.

Perfusion and sacrifice

The following procedures will be applied depending on the animal serie:

- serie of animals for immunohistochemistry: under terminal anaesthesia, the animals will receive an i.v. perfusion of fluorescent probes to label the vasculature and assess the blood brain barrier permeability. After termination of the i.v. perfusion of probes, animals will be perfused with fixatives before decapitation and tissue collection;
- serie of animals for flow cytometry and molecular work: blood will be collected from the aorta until cardiac arrest of the animals. Saline solution will then be perfused before decapitation and tissue collection.

- **References are listed at the end of the box/part B.**

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

To determine group size, a statistical power calculation will be performed based on the Sachs' formula $n=2[(\alpha+\beta)^2 \times \sigma^2]/\Delta^2$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlin, Springer Verlag). This is to guarantee that the sample size, in the respective experimental setup, will guarantee the detection of a given variation (decided prior). Our calculations will be based on previous own studies and existing publications.

In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,...), thus limiting the total number of animals to be used to achieve the study aims.

B. The animals

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

Species: *Mus musculus*

Strains: Cx3Cr1^{GFP/WT} x Thy1^{YFP/0} mice resulting from the crossing of Cx3Cr1^{GFP/GFP} (Jackson Laboratory Stock number 005582) and Thy1^{YFP/0} (Jackson Laboratory Stock number 003782) will be used while they are in their adult life stage.

Cx3Cr1^{GFP/WT} have been widely used to follow microglia over time and investigate their contribution in many different pathological conditions^{13,16-18}, while Thy1^{YFP/0} were used to follow the process of neuronal degeneration over time^{16,19-21}.

Mice from the 2 strains described above will be crossed to obtain Cx3Cr1^{GFP/WT} x Thy1^{YFP/0}. Both separate strains as well as the crossed mice have been already bred locally and don't show any sign of discomfort. These crossed mice will offer thus the possibility to assess the impact of cerebral hypoperfusion on the microglial and neuronal states over time as well as their interplay during the development of the pathology.

Estimated numbers (see table below):

A first group of 40 animals is required for the optimization of the BCAS and cranial window techniques to be used with this animal model (pilot study). This is to ensure the success of the whole study.

The main goal of the pilot study is to implement the BCAS surgery locally. A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be also tested in combination with the cranial window surgery. The CBF reduction and the survival rate will be analysed and compared to the data from literature.

The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :

- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that does not exceed the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

For the BCAS experimental groups, taking into account the variability of the different measurements, the success rate of the surgical interventions (80-85%) and the 2 series of animals needed per group to collect fixed (immunohistochemistry of whole brains, 10 mice/group) and non-fixed tissues (flow cytometry on whole brain lysates, 10 mice/group), it can be estimated that a total of 25 animals per BCAS group and per timepoint (a + b) is required ((10+10)/0.8 = 25). For the Sham groups, the expected drop due to surgery being lower (5%), the total number of animals per Sham group and per timepoint is (10+10)/0.95 = 21.

The total number of animals requested for this project is summarized in the table below and is estimated to 224 mice over a period of 3 years.

Group n°	Goal	Surgery	Treatment	Sub-groups	Acute timepoint	Chronic timepoint	Estimated number of animals
Pilot	Optimization	Sham/BCAS	-		x	x	40
1	Experimental	Sham	Vehicle	1a	x		21
				1b		x	21
2	Experimental	BCAS	Vehicle	2a	x		25
				2b		x	25
3	Experimental	Sham	Treatment	3a	x		21
				3b		x	21
4	Experimental	BCAS	Treatment	4a	x		25
				4b		x	25
		Total estimated number of animals					224

References:

- Bollinger, J. L., Bergeon Burns, C. M. & Wellman, C. L. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. *Brain Behav. Immun.* **52**, 88–97 (2016).
- Crain, J. M., Nikodemova, M. & Watters, J. J. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult CNS in male and female mice. *J Neurosci Res* **91**, 1143–1151 (2013).
- Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D. & Liu, F. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation* **12**, 32 (2015).
- Li, R. & Singh, M. Sex Differences in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Front Neuroendocrinol* **35**, 385–403 (2014).
- Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82**, 380–397 (2014).
- Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12**, 139 (2015).
- Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35**, 2598–2603 (2004).
- Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41**, 1278–1284 (2010).
- Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34**, 319–337 (2013).
- Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J. & Gan, W.-B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* **5**, 201–208 (2010).
- Akkerman, S. *et al.* Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav. Brain Res.* **232**, 335–347 (2012).
- Drew, P. J. *et al.* Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat. Methods* **7**, 981–984 (2010).
- Lou, N. *et al.* Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 1074–1079 (2016).
- Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38**, 2826–2832 (2007).
- Gooch, J. & Wilcock, D. M. Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID). *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 233–239 (2016).
- Evans, T. A., Barkauskas, D. S., Myers, J. T. & Huang, A. Y. Intravital Imaging of Axonal Interactions with Microglia and Macrophages in a Mouse Dorsal Column Crush Injury. *Journal of Visualized Experiments* (2014). doi:10.3791/52228
- Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4106–4114 (2000).
- Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155**, 1596–1609 (2013).
- Feng, G. *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of

GFP. *Neuron* **28**, 41–51 (2000).

20. Greenberg, M. L. *et al.* Two-photon imaging of remyelination of spinal cord axons by engrafted neural precursor cells in a viral model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E2349–2355 (2014).

21. Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C. & Clascá, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* **1345**, 59–72 (2010).

22. Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. & Hu, X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* **26**, 627–634; discussion 635 (1995).

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:

Our study focuses on the interplay of 3 cellular compartments over time in presence or absence of a proper cerebral perfusion. There is no in vitro alternative method for this study. In addition, the cognitive function will also be evaluated to assess the relevance of the study to the clinical situation. The use of an animal model is therefore mandatory to achieve the research aims.

Reduction:

The number of animals required per group is calculated, based on previous own studies and existing publications, to guarantee that the statistical power will be reached with the minimal number of animals. In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,...).

Refinement:

The mice to be used are transgenic animals that harbor fluorescent proteins in the cells of interest. This enables tracking of those cells in vivo and a better imaging quality than any staining or labeling technique. Thus the critical steps associated with staining/labelling will be avoided. Those mice will undergo a well-established surgical intervention to induce cerebral hypoperfusion. The BCAS model has been validated in several studies to induce a 30% CBF reduction (microcoils with a diameter of 0.18 mm^{7,8}) that is associated with cognitive dysfunction, and is therefore recognized as a relevant animal model for the study of vascular cognitive impairment¹⁵. The combination of this surgical intervention on the transgenic mice is the perfect combination to achieve the goals of the proposed study. In addition, several parameters will be collected from the same animals, thus allowing to better relate experimental observations within a same animal.

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

An adequate level of anesthesia will be induced to guarantee the absence of suffering during the surgical interventions. In addition, prior and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent suffering during the recovery from surgery.

Animals will be carefully examined throughout the entire duration of the study for the early detection of pain signs.

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.

n.a.

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.

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.

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

Welfare score sheets will be filled in for each animal and will be used throughout the entire duration of the study to ensure that the discomfort of the animals do not exceed the humane endpoints defined for the study (part J).

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- 1) As a result of the BCAS surgery, animals will exhibit a decreased cognitive function (expected);
- 2) Possible complications after cranial window surgery or BCAS surgery (e.g. damage to the cranial window caused by the animal: detachment of the dental cement border),;
- 3) Possible complications due to drug treatment due to an unknown toxicity.

Explain why these effects may emerge.

- 1) This effect is expected and is part of the pathology studied;
- 2) This effect might occur following the surgical interventions;
- 3) Although the treatment will be selected on different criteria including toxicological safety, it is not possible to predict the absence of toxicity in our particular model studied.

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

- 1) If the severity of the cognitive dysfunction leads to the humane endpoint described below (part J), the animal will be euthanized to avoid unnecessary pain or distress;
- 2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, a.o.) and a solution will be implemented to avoid future complications. Surgeries will be performed with sterile tools in an aseptic environment to prevent the occurrence of infections. In case of a skin infection, the wound will be cleaned with an antiseptic and an anti-inflammatory drug will be administered to limit the associated inflammatory reaction. The infected animal will be monitored carefully and will receive a painkiller drug to avoid unnecessary pain. If the infection can't be controlled, the animal will be euthanized. In case the dental cement border of the cranial window is getting loose or has been detached by the animal, an administration of a painkiller will be done to avoid any unnecessary pain and a new dental cement protection will be created under anaesthesia.
- 3) If the toxicity observed leads to a discomfort exceeding the moderate discomfort expected for the study and/or if it impairs the interpretation of the data, the treatment will be interrupted and animals will be euthanized if humane endpoints are reached.

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.

Animals will be inspected regularly to monitor their welfare. The observations (body weight, overall condition, 18-points Garcia neurological score based on locomotor activity and body proprioception) will be registered in an animal welfare score sheet.

The Garcia neurological test will be used weekly to assess eventual motor and behavioral deficits

indicative of major neurological damage such as stroke. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum²².

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following BCAS surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described⁷;
- a Garcia score ≤ 10 (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will reflect a severe alteration of behaviour and locomotor activity due to a major cerebral injury.

Animals fulfilling one of these criteriae will be considered with severe discomfort and will be immediately euthanized to avoid any unnecessary stress and pain using a CO2-euthanasia system.

Indicate the likely incidence.

The expected incidence is low (5%).

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').

Procedure	Expected level of discomfort (overall % of animals impacted)
Animal handling, and body weight measurement	mild (100%)
Drug treatment (water or food)	mild (50% - 3a, 3b, 4a, 4b)
Thinned skull cranial window surgery & imaging	mild (100%)
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS) or Sham	moderate (100%)
Consequences of BCAS	moderate (50% - Pilot, 2a, 2b, 4a, 4b)
Brain laser Doppler flowmetry (LDF)	mild (100%)
Y-maze alternation task	mild (100%)
Object Location Task (OLT)	mild (100%)
Barnes maze test	mild (50% - 1b,2b,3b,4b)
Cumulative discomfort – Pilot study	moderate
Cumulative discomfort - Experiment	moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The study required analysis of brains post-mortem.

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 PV 2017-001/

Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation*
3. **Titel van de NTS:** *Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie*
4. **Type aanvraag:**
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC: *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC; 11-05-2017
aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken; 19-05-2017
anderszins behandeld
 - ☒ termijnonderbreking van 25-05-2017 tot 14-07-2017
besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
aanpassing aanvraag
advies aan CCD
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum; 25-05-2017

Gestelde vragen en antwoorden:

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Vraag:

1. In hoeverre is het effect van een lekkende BBB toe te schrijven aan microglia, m.a.w., kunnen er niet nog tal van andere mechanismen een rol spelen en in hoeverre kunnen die eventueel worden meegenomen in het project.

Antwoord:

In addition to microglia, other immune cells may play a role in Vascular Cognitive Impairment pathologies following BBB injury. The main focus of the proposed study is on microglia but in case findings show a limited impact of microglia in this model, other immune cells may be investigated as a rescue plan. Another animal project, specifically designed for the study of immune cell contribution in sporadic hypertensive cSVD, has been submitted to the animal welfare body.

3.2 Doel

Vragen:

1. De DEC-UM verzoekt u bij Aim 1 ook infiltratie toe te voegen?

Antwoord:

This project is not aimed to study the contribution of infiltrated immune cells in VCI. As explained in the previous answer (above), the infiltration of immune cells will be studied as an alternative plan or as a sub-study but the design of the experimental project has been prepared for the study of microglia primarily.

2. De DEC-UM vraagt zich af of Aim 2, zoals deze nu omschreven is, niet reeds vervat zit in Aim 1. Tevens is het niet duidelijk waar de verder beschreven behandeling onder valt.

Antwoord:

The experimental groups in the proposed project will target both Aim 1 and 2. The study of the animal groups 1 and 2 will provide data for Aim 1 while the animal groups 3 and 4 will be compared to the groups 1 and 2 to target the Aim 2.

3.3. Belang

Vragen:

1. Hoeveel cognitieve impairment/dementie is het gevolg van een vasculaire dysfunctie? Nu lijkt het alsof dit 100% is.

Antwoord:

This is still unclear as tools/biomarkers to assess BBB dysfunction in patients using MRI strategies are still being developed and are not incorporated in the routine diagnostic investigations. More clinical research is thus needed to determine the exact extent of the vascular damage to cognitive impairment/dementia cases. A short explanation has been added in the text.

2. In hoeverre onderscheidt het korte- versus lange-termijn geheugenverlies zich van retrograde of anterograde amnesie?

Antwoord:

Short and long-term memories differ from retrograde amnesia since the memory about the location of the object in the case of the OLT is formed after potential brain injury (except in the very unlikely situation when a brain injury might occur during the inter-trial period of the test (1h or 24h)). The expected short- and long-term memory losses are partly overlapping with anterograde amnesia. In anterograde amnesia, there is a failure to store new information: it means to convert short-term memory into long-term memory.

3. De DEC-UM vraagt zich af of in de projectopzet ook een verband gezocht wordt tussen de mate van (on)gevoeligheid voor BCAS en microglia (dys)functie?

Antwoord:

No, it may be scientifically/statistically difficult to find inter-individual differences for cerebral hypoperfusion sensitivity and potential microglial dysfunction.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Vragen:

1. In het kader van een reductie van het aantal proefdieren vraagt de DEC-UM zich af of een Sham groep bij de pilot nodig is om BCAS aan te leren?

Antwoord:

The Sham group is of importance for the pilot study for the following reasons:

- Statistical validation of the decrease of the cerebral blood flow (laser Doppler). Sham and BCAS groups should be balanced (similar n) for a proper validation. Indeed, the BCAS surgery should lead to a reproducible reduction of the cerebral blood flow with a drop-out post-surgery that corresponds to the expectations (approximately 20%);
- the pilot study is not only required to learn the BCAS surgery but also to assess its feasibility in combination with the cranial window surgery and imaging. It is of major importance to demonstrate the BBB integrity in the Sham animals over time to be able to assess the BBB dysfunction in the BCAS mice.

2. Waarom wordt geopteerd voor een bilaterale BCAS? De achtergrond lijkt te suggereren dat dit niet noodzakelijk is.

Antwoord:

The diameter of both carotids need to be reduced to lead to a sustained CBF reduction.

3. De DEC-UM vraagt om duidelijk aan te geven dat de craniale window operatie eerst gebeurt. Nu is dit op verschillende plaatsen onduidelijk.

Antwoord:

This has been modified accordingly.

4. De DEC-UM vraagt zich af of hoe het mogelijk is om activiteit te meten van de microglia met de aangegeven transgene muis. Het lijkt alsof enkel expressie kan worden opgevolgd.

Antwoord:

The microglial phenotype can be assessed over time by morphological analyses (soma volume, length of processes). A more refined analysis of the microglial activity can be done ex vivo by IHC and flow cytometry.

5. De DEC-UM vraagt om hier al duidelijk aan te geven hoe cognitieve impairment wordt bestudeerd.

Antwoord:

A short description of the cognitive tasks to be performed has been added in the paragraph 3.4.1.

6. De DEC-UM vraagt zich af welke behandeling gekozen wordt. In het schema staat 1 behandeling aangegeven. Indien nog geen behandeling gekozen is, graag beargumenteren welke de beslisriteria zijn.

Antwoord:

The definite treatment choice (only one treatment) will be made at the end of other ongoing animal studies (not the proposed project) in which safety and efficacy will be assessed. The choice will be made during the preparation of the work protocol. This answer has been added to the corresponding paragraph.

7. Mogelijke drop-out van BCAS is aangegeven. Is dit ook duidelijk voor het craniale window?

Antwoord:

There is no drop out expected for the cranial window surgery, as the surgery is already mastered and the cranial window itself does not cause any injury to the animal.

8. De DEC-UM vraagt zich af of de behandelingsgroepen niet na de vehicle groepen kunnen gedaan worden. Wat als microglia niet betrokken zijn (dan lijkt behandelingsgroep overbodig)?

Antwoord:

I understand the reasoning for the proposed 2-steps approach. Such sequential approach has been proposed initially. However taking into account the high chance of observing microglial activation in this model (based on literature), this 2-step approach has been finally deleted in order to reduce the number of animals. Indeed, if microglia are activated upon cerebral hypoperfusion (which is likely), then the interventional study will have to include also non treated animals (similarly to the first study with no treatment). The one-step approach proposed is therefore thought to reduce the number of animals.

9. Wat als er meer oefening nodig is? Is het dan niet handig om op voorhand meer pilot dieren aan te vragen? Nu staat er dat het project dan gestopt wordt.

Antwoord:

It is indeed difficult to assess the number of animal required to learn the BCAS surgery, to combine it with the thinned skull cranial window surgery and the imaging. I initially estimated that a total number of 20 mice would be enough (10 Sham / 10 BCAS) to validate the procedure. However I agree it is safer to plan more animals than needed (20 Sham / 20 BCAS) and to decide for a threshold to stop the pilot study. Thus, as soon as 10 successful surgeries (BCAS combined with cranial window) will be performed per group, with reaching of the already mentioned criteria (reproducible reduction (-20 to -40%) of CBF, drop-out rate for BCAS limited to 20%; good visualization of vasculature, microglia), no additional animals will be used for the pilot project and the study of the experimental groups will be initiated. By requiring 10 successful experiments per group, this will guarantee the success of the whole project.

The rectified number of animals for the pilot study and the explanation for the proposed threshold have been added to the project.

3.4.2

Vragen:

1. De Y-maze betreft een gevoelige taak met geregeld snelle habituatie/desensitisatie. In hoeverre houden de onderzoekers hiermee rekening gezien het feit dat er wordt beoogd dat deze taak herhaaldelijk wordt gebruikt?

Antwoord:

As proposed in the Appendix 1, this task will be performed only twice: at the “acute” and “chronic” timepoints with a “washout” period of approximately 3 weeks. The desensitization is therefore thought to be limited.

3.4.4

Appendix 1

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. De DEC-UM vraagt om duidelijk te beargumenteren waarom enkel mannelijke dieren gebruikt kunnen worden. Wat zijn deze “sex differences”?

Antwoord:

Sex-specific differences that may have an impact on the studied pathological mechanism have been described with more details.

2. Hier worden 2 behandelingsmethodes beschreven, terwijl in de figuur maar 1 gekozen wordt. Welke en waarom?

Antwoord:

The therapeutic intervention proposed will target microglia cells. There are currently studies ongoing evaluating strategies for microglial cell depletion or inhibition of microglial activity. Therefore both options are presented for the present project but only one option will be chosen and applied. The relevant choice will be made at the time of the study start once more results will be available regarding both therapeutic strategies.

3. De DEC-UM vraagt ook om kort de procedure van de craniale window te beschrijven, aangezien dit ook gedaan is voor BCAS en TPLSM.

Antwoord:

A short description has been added.

4. Kunnen de onderzoekers verhelderen wat de toegevoegde waarde is van het testen van zowel de OLT als de Barnes Maze? Beiden testen spatueel hippocampaal geheugen, op korte dan wel lange termijn (interval)? Ook de OLT is laag qua stressniveau (nu als argumentatie voor Barnes Maze gehanteerd).

Antwoord:

Both tasks test indeed the spatial memory of the animals. However the OLT will assess more the short-term/working memory while the Barnes maze task will assess the long-term spatial learning and memory. In addition, it won't be possible to perform the Barnes maze task for the acute hypoperfused groups due to time limitation between the induction of the hypoperfusion and the sacrifice of the animals.

B. De Dieren.

5. Aangezien de verhoogde verwachte uitval bij de BCAS groepen, zou de groepsgrootte daarop verder moeten worden aangepast met de Sham groep en dienen de B groepen dan gelijk van grote te zijn in vergelijking met de A groepen?

Antwoord:

The expected drop of animals in the BCAS groups (20%) compared to the Sham groups (5%) being higher, it is indeed possible to reduce the size of the Sham groups. The adapted calculation is provided in the text and the corresponding table has been amended as well.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.

6. Effecten voor craniale window zijn niet omschreven.

Antwoord:

The only adverse effect that can take place after cranial window surgery is the removal or detachment of the dental cement border fixed on the skull. This has been inserted in the text in the description part for the possible adverse effects and the measure to be adopted has been also added in the next paragraph.

J. Humane eindpunten.

7. Wordt er niet een Garcia score > 10 bedoeld als humaan eindpunt?

Antwoord:

No, in the Garcia scale, a maximal score of 18 corresponds to a normal healthy animal without any sign of locomotor and proprioception impairments. 6 quick tests looking at the sensorimotor function are graded from 0 to 3 (3 = normal; 0 = severe impairment)

K. Classificatie van ongerief.

8. Craniale window lijkt de DEC-UM minder invasief/minder discomfort dan BCAS procedure en toch gelinkt met een hogere ongerief score.

Antwoord:

Indeed, this was a mistake and it has been corrected.

- Datum antwoord; 14-07-2017
- Verstreckte antwoorden; zie hierboven
- De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. **Eventuele adviezen door experts: N.V.T.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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

Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Het directe doel van het project is onderzoek naar de rol van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotisstenose.

Het uiteindelijke doel is het ontcijferen van de pathologische cascade die is gekoppeld aan cerebrale hypoperfusie.

Het betreft hier een fundamenteel wetenschappelijk project.

Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat er belangrijke stappen richting het uiteindelijke doel gezet kunnen worden binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is, wat de positie van de eigen onderzoeksgroep daarin is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.

De DEC-UM is op grond hiervan van mening dat het directe doel, onderzoek naar de rol van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotisstenose, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel wetenschappelijke project, dat gericht is op begrip van de bijdrage van vasculaire dysfunctie aan het ontstaan van cognitieve beperking, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. patiënten met cognitieve beperkingen en dementie en hun naasten en de medische wetenschap.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie, het gaat hier om transgene proefdieren, de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen matig ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: *De onderzoekers zullen nieuwe medisch-wetenschappelijke inzichten verkrijgen en deze kennis delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap.*

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: *Verbeterde kennis over het ontstaan van cognitieve beperkingen kan mogelijk leiden tot aanzetten tot preventie en therapie. Aangezien cognitieve beperkingen en dementie een zware last zijn voor de getroffen en hun omgeving, kan ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.*

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

Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

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

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

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: Door de genetische modificatie, de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind van de proef.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

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

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

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

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe.

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

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

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

*De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren.
De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren.*

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

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.V.T.**

NTS

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

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het onderzoek naar de rol van van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotisstenose, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation?"

- 2.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis met potentieel maatschappelijke impact.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen die op termijn worden getroffen door cognitieve beperking en dementie en hun naasten binnen het project "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation*" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie, de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter bijdragen aan de kennis over het ontstaan van cognitieve beperkingen en dementie. Deze kennis kan behulpzaam blijken bij de preventie van cognitieve beperkingen en dementie en bij eventuele therapie.

Voor toekomstige patiënten en hun naasten is het belangrijk dat de beschikbare preventiemethoden en eventuele therapie telkens worden verbeterd. Ten opzichte van de huidige mogelijkheden kan daardoor de ernst van de ziektelast voor patiënten afnemen. Tevens zou dit bijdragen aan de verbetering van kwaliteit van leven voor patiënten en hun naasten.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang.

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

3.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het onderzoek naar de rol van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotisstenose, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation*?" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis. Aan het begin van dit onderzoeksproject wordt er een extern deskundige bij betrokken om de benodigde technische expertise te waarborgen. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning.

De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation*" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation*" van een positief advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD1070020172885

Bijlagen

2

Datum 8 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 augustus 2017. Het gaat om uw project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1070020172885. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. 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 kan uw aanvraag buiten behandeling worden 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.centralecommissiedierproeven.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

Datum:

8 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1070020172885

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020172885

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10700
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 50169181
Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6
Postbus: 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
IBAN: NL04 INGE 0679 5101 68
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

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

Datum:

8 augustus 2017

Aanvraagnummer:

DEC070020172885

Over uw project

Geplande startdatum:

1 september 2017

Geplande einddatum:

1 september 2020

Titel project:

Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation

Titel niet-technische
samenvatting:

Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie

Naam DEC:

DEC UM

Postadres DEC:

Postbus 616, 6200 MD Maastricht

E-mailadres DEC:

secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 935,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Maastricht

Datum:

7 augustus 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD1070020172885

Bijlagen

2

Datum 8 augustus 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 8 augustus 2017

Vervaldatum: 7 september 2017

Factuurnummer: 172885

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1070020172885	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 23 augustus 2017 14:42
Aan: Info-zbo
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Re: AVD1070020172885:aanvullende informatie
Bijlagen: AVD1070020172885 aanvraag-projectvergunning V2.docx; AVD1070020172885 Appendix 1 V2.docx; AVD1070020172885 NTS v2.docx; AVD1070020172885 project proposal V2.docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Dear [REDACTED], Dear CCD officers,

Thanks for your e-mail. Please find below my answers to the questions raised during the review of the project application **AVD1070020172885**. Please find attached the corresponding corrected files. Corrections made on the previous version are highlighted in gray in the text.

"U geeft aan dat het ongerief Matig is. Uit de humane eindpunten valt echter op te maken dat de dieren worden gedood als ze ernstig ongerief hebben. Dit betekent dat de humane eindpunten ernstig ongerief niet voorkomen en maximaal 5% van de dieren ernstig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te verhelderen en de bijlage dierproeven aan te passen."

Answer: The overall discomfort for the animals will be moderate. However in case the pathological condition would be worst than expected for some animals (incidence 5% maximum), these animals will be euthanised to avoid unnecessary discomfort using the defined human endpoints. The regular inspections to monitor the animal welfare that include the registration of the body weight, general behaviour and neurological score, will serve to ensure that the animals do not reach a severe discomfort. We aim to detect early signs of a potential transition from moderate to severe discomfort. This has been clarified accordingly in the text.

- "U wordt verzocht de NTS aan te passen: De titel is niet begrijpelijk voor een leek en u geeft niet aan waarom de dieren worden gedood."

Answer: The title of the NTS has been changed to improve its understanding by the society. The previous title "Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie" has been changed to "Verminderde bloedtoevoer in de hersenen en dementie". This has been implemented in the NTS document as well as in the aanvraag-projectvergunning file. In addition, one sentence has been added to explain why the animals are sacrificed at the end of the experiment (brain collection for analysis).

I remain at your disposal should the CCD have further questions.

De : Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>

Date : Wednesday, 23 August 2017 at 12:18

À : [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Op 7 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1070020172885. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

-U geeft aan dat het ongerief Matig is. Uit de humane eindpunten valt echter op te maken dat de dieren worden gedood als ze ernstig ongerief hebben. Dit betekent dat de humane eindpunten ernstig ongerief niet voorkomen en maximaal 5% van de dieren ernstig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te verhelderen en de bijlage dierproeven aan te passen.

-U wordt verzocht de NTS aan te passen: De titel is niet begrijpelijk voor een leek en u geeft niet aan waarom de dieren worden gedood.

Opsturen binnen veertien dagen

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 24 augustus. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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).

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: Info-zbo

Verzonden: dinsdag 8 augustus 2017 13:28

Aan:

Onderwerp: OntvangstBevestiging 2885

Geachte [REDACTED],

Deze brief is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of 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>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in	10700
		☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	50169181
		Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6
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>	Postbus	616
		Postcode en plaats	6200 MD MAASTRICHT
		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- | | | | |
|-----|--|--|--|
| 1.6 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning. | (Titel) Naam en voorletters | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| | | Functie | |
| | | Afdeling | |
| | | Telefoonnummer | |
| | | E-mailadres | |
| 1.7 | Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde? | ☐ Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>
☒ Nee | |

2 Over uw aanvraag

- | | |
|---|--|
| <p>2.1 Wat voor aanvraag doet u?</p> | <p>☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3</p> <p>☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn</p> <p>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2</p> <p>☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn</p> <p>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3</p> |
| <p>2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?</p> | <p>☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier</p> <p>☐ Nee > Ga verder met vraag 3</p> |
| <p>2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?</p> | <p>☐ Nee > Ga verder met vraag 3</p> <p>☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6</p> |

3 Over uw project

- | | | | | | | | | |
|-------------|--|--|------------|--------------|-----------|-----------------------------------|-------------|--|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project? | <table border="1"> <tr> <td>Startdatum</td> <td>1 - 9 - 2017</td> </tr> <tr> <td>Einddatum</td> <td>1 - 9 - 2020</td> </tr> </table> | Startdatum | 1 - 9 - 2017 | Einddatum | 1 - 9 - 2020 | | |
| Startdatum | 1 - 9 - 2017 | | | | | | | |
| Einddatum | 1 - 9 - 2020 | | | | | | | |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation | | | | | | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | Verminderde bloedtoevoer in de hersenen en dementie | | | | | | |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | <table border="1"> <tr> <td>Naam DEC</td> <td>DEC UM</td> </tr> <tr> <td>Postadres</td> <td>POSTBUS 616
6200 MD MAASTRICHT</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl</td> </tr> </table> | Naam DEC | DEC UM | Postadres | POSTBUS 616
6200 MD MAASTRICHT | E-mailadres | secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl |
| Naam DEC | DEC UM | | | | | | | |
| Postadres | POSTBUS 616
6200 MD MAASTRICHT | | | | | | | |
| E-mailadres | secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl | | | | | | | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?	☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 Lege ☐ Wijziging € Lege
4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>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.</i>	☐ 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 ☒
----------------------------------	---

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 1.7). 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. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">Naam</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plaats</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td style="text-align: center;">- -</td> </tr> <tr> <td>Handtekening</td> <td style="height: 50px;"></td> </tr> </table>	Naam		Functie		Plaats		Datum	- -	Handtekening	
Naam											
Functie											
Plaats											
Datum	- -										
Handtekening											



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Carotid artery stenosis, as a result of hypertension, dyslipidemia, diabetes as well as ageing, interferes with the cerebral autoregulation and leads to cerebral hypoperfusion. This is considered as a major trigger for the development of vascular cognitive impairment (VCI)¹. Following the induction of

carotid artery stenosis in mice, their cognitive function is selectively impaired over time (working memory altered first, followed by impairment of short/long-term memories at a chronic timepoint)^{2,3}. However the different key players involved in this pathological cascade and their involvement in a time-dependent manner remain elusive. We showed that microglia cells are involved in the pathological cascade of hypertension-induced VCI⁴. Indeed, leakages of the blood brain barrier (BBB), due to the elevated blood pressure, are associated with an increased density and activation of microglia.

Microglia are the resident immune cells of the brain and protect it from neurodegeneration. Brain injury, including cerebrovascular injuries⁵, leads to morphological changes, migration and proliferation of microglial cells at the site of injury. In addition to the phagocytosis of dead cells and debris, activated microglia also release cytokines to maintain local homeostasis, and therefore protect neuronal function. This protective phenotype is believed to take place in an acute manner. However upon exposure to chronic pathological conditions, microglial activation is associated with neurotoxic functions and the emergence of an aberrant inflammatory response (increased synthesis of cytokines: a.o. IL-1 β , TNF- α , IL-6⁶) a phenomenon leading to neurodegeneration⁷.

Although their ability to activate upon hypoxic conditions has been proven in vitro⁸, there is no direct in vivo evidence linking tissue hypoperfusion to microglial activation. Furthermore the subsequent consequences of microglial activation on cerebrovascular (BBB) and neuronal integrities is unknown. It is therefore of utmost importance to study their activity in vivo over time (upon acute and chronic hypoperfusion).

In addition to microglia, other immune cells may play a role in Vascular Cognitive Impairment pathologies following BBB injury. The contribution of other immune cells in this pathological condition will be studied in case findings regarding the impact of microglia in this pathology is limited.

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?

Overall objective:

The aim of the present study is to decipher the pathological cascade associated with cerebral hypoperfusion. In particular the present project will investigate the role of microglia cells on the vascular and neuronal compartments during cerebral hypoperfusion.

Aim 1: Pathological cascade of cerebral hypoperfusion

Determine if acute and chronic cerebral hypoperfusion are associated with Blood Brain Barrier leakages, microglial activation, neurodegeneration and cognitive impairment.

Aim 2: Modulation of microglial activity/presence during cerebral hypoperfusion

Determine if microglia cells exhibit a protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion by modulating their function and/or density in the brain.

Achievability:

This research project is achievable within a reasonable time frame (3 years) and with a limited number of animals. Most of the techniques, including the thinned skull cranial window, required to perform this project are already present within the research group. The involved researchers have a long-standing experience with the main procedures described in this project: carotid surgery, cerebral blood flow measurement, cranial window, in vivo imaging, behavioural tasks and animal perfusion. In addition, the implementation of BCAS surgery, which is a similar surgery that one already mastered on site (placement of a carotid cuff), will be taught by external researchers experts in this technique (national collaboration).

3.3 Relevance

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

Cognitive impairment and dementia, are major disabilities increasing due to population ageing. The World Health Organization estimates that 35 million people live with dementia and expects this number to triple by 2050⁹. Major progresses in the last decade have revealed the contribution of vascular dysfunction to cognitive impairment¹⁰, but the extent of this contribution to all cognitive impairment/dementia cases is still unclear as tools/biomarkers to detect small vessel disease pathology in the brain have been only validated recently. Vascular Cognitive Impairment (VCI) encompasses all the cognitive disorders associated with cerebrovascular disease, from frank dementia to mild cognitive deficits¹. The present project is therefore of major importance to improve our understanding of the pathology and to identify potential therapeutic target to limit/delay its progression.

3.4 Research strategy

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

3.4.1 – Project design

Project description

Animals and surgery

Transgenic reporter mice expressing Green Fluorescent Protein (GFP) in microglia (Cx3Cr1-GFP) and Yellow Fluorescent Protein (YFP) in neurons (Thy1-YFP) will undergo a thinned-skull cranial window surgery followed by a Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS) procedure to induce cerebral hypoperfusion (or sham operation)^{11,3}. Two-photon imaging of the cerebral cortex through the thinned-skull cranial window will allow the study over time of the vascular, microglial and neuronal compartments.

Cerebral blood flow, in vivo imaging and cognitive function (Aim 1 & 2)

At all timepoints, the cerebral blood flow will be measured using a trans-cranial laser Doppler flowmeter. In vivo imaging (via the cranial window) will be performed before the BCAS surgery, few days after (acute timepoint) and up to one month after the surgery (chronic timepoint), in order to assess the activity/phenotype of microglia over time. The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery (acute and chronic). Investigations of the cognitive function at both (acute and chronic) timepoints is needed as it has been suggested that working and short-term memories may be impaired at an earlier timepoint than long-term/reference memory in this model³. Working memory will be assessed with the use of a Y-maze alternation task, short-term and long-term memory with an Object Location task and spatial learning and long-term memory with the Barnes maze task. Brains from sham and BCAS reporter mice will be harvested for further investigations of microglial phenotype by flow cytometry and for 3D histology¹².

Treatment (Aim 2)

A pharmacological intervention to modulate the activation of microglia or to decrease their density will be performed in sham and BCAS mice. Targeting microglia in BCAS animals will allow us to decipher their protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion. One possible approach (amongst others) to investigate the role of microglia is to use a therapeutic intervention to deplete the microglial population via inhibiting CSF1 receptor signaling. This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals^{13,14}. The definite treatment choice will be made at the end of other ongoing animal studies (not the proposed project) in which safety and efficacy will be assessed. The choice will be made during the preparation of the work protocol.

Experimental design

1) Pilot study

A pilot study will be performed to implement the BCAS surgery and to validate the readouts for in vivo imaging in this animal model before the study of the experimental groups.

A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be tested in combination with the cranial window surgery.

In this pilot study both Sham and BCAS groups are required.

The Sham group is of importance for the pilot study for the following reasons:

- Statistical validation of the decrease of the cerebral blood flow (laser Doppler). Sham and BCAS groups should be balanced (similar n) for a proper validation;

- the pilot study is not only required to learn the BCAS surgery but also to assess its feasibility in combination with the cranial window surgery and imaging. It is of major importance to demonstrate the BBB integrity in the Sham animals over time to be able to assess the BBB dysfunction in the BCAS mice.

The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :

- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that corresponds to the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

20 mice per group (Sham/BCAS) are planned for the pilot study. However as soon as the threshold of 10 successful experiments (BCAS + cranial window + imaging) will be reached per group (with the above-mentioned criteria), no additional animals will be used for the pilot project and the study of the experimental groups will be initiated.

2) Acute and chronic BCAS to evaluate the pathological cascade and effects of microglia modulation as defined in aims 1 and 2

A phased design between the acute and chronic timepoints is not possible within this project. Indeed, while acute hypoperfusion can lead to a decline in the working memory, short and long-term memory impairment can only be detected after a longer exposure to hypoxic conditions^{3,2}. It is therefore mandatory to study both timepoints as the brain areas targeted by acute and chronic hypoperfusion can differ (in relation to the type of memory dysfunction). In addition, it is known that microglial behaviour can differ between acute and chronic stimuli, harbouring respectively either a protective or a deleterious phenotype. Their study over time is therefore also required.

The different steps of the project and their logical sequence are shown in Figure 1 (below, next page).

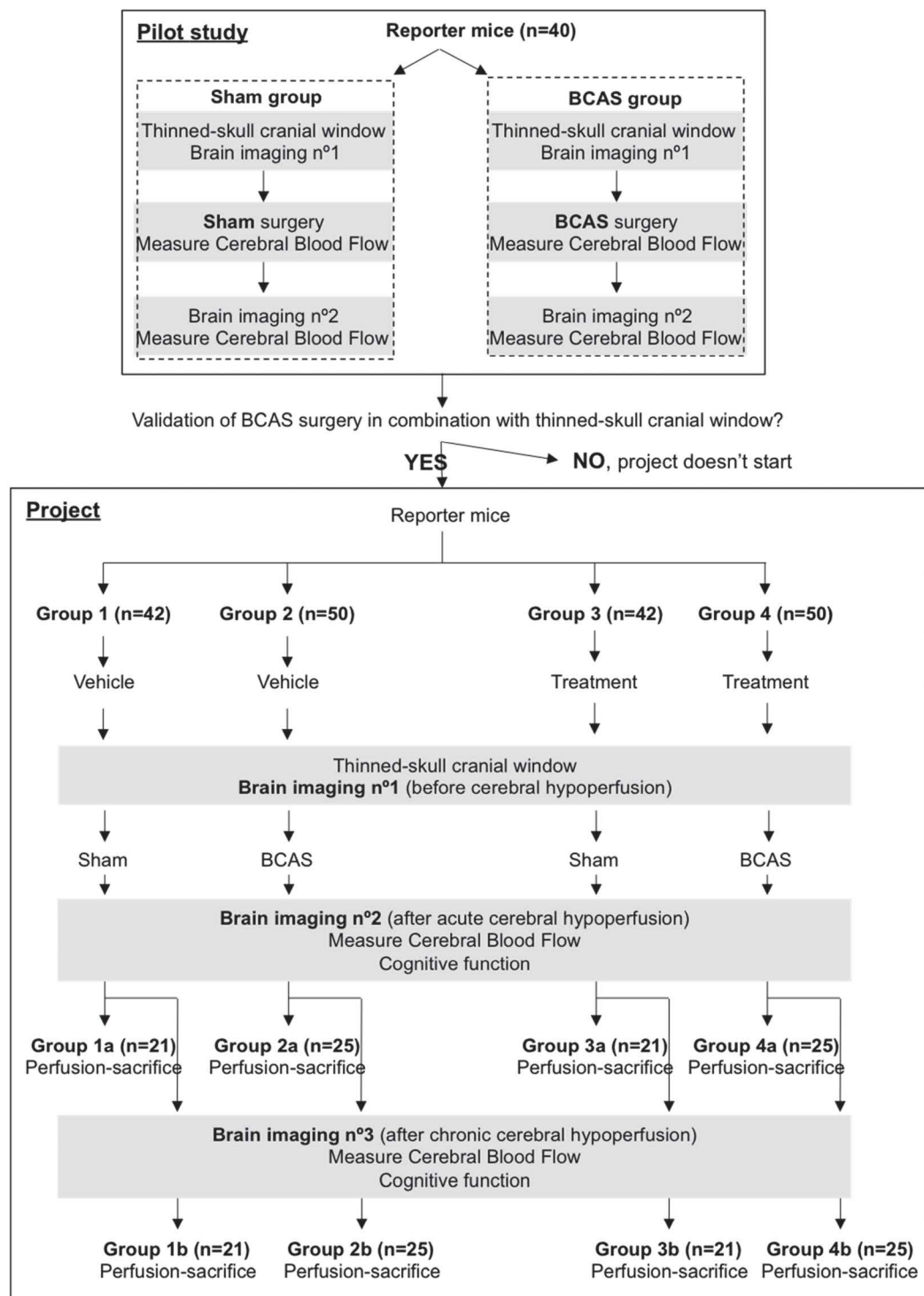


Figure 1: Overall design of the project

References:

1. Iadecola, C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* **80**, 844–866 (2013).
2. Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38**, 2826–2832 (2007).
3. Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41**, 1278–1284 (2010).

5. Nishimura, N. & Schaffer, C. B. Big effects from tiny vessels: imaging the impact of microvascular clots and hemorrhages on the brain. *Stroke* **44**, S90–92 (2013).
6. Perry, V. H. & Holmes, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **10**, 217–224 (2014).
7. Luo, X.-G., Ding, J.-Q. & Chen, S.-D. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **5**, 12 (2010).
8. Li, F. *et al.* Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* **12**, 111 (2011).
9. World Health Organization & Alzheimer's Disease International. *WHO | Dementia: a public health priority*. (2012).
10. Gorelick, P. B. *et al.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* **42**, 2672–2713 (2011).
11. Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35**, 2598–2603 (2004).
12. Pan, C. *et al.* Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* **13**, 859–867 (2016).
13. Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82**, 380–397 (2014).
14. Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12**, 139 (2015).
15. Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34**, 319–337 (2013).

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.

3.4.2 – Procedures

Listing of the procedures:

- Handling and weighting the animals;
- Sham or BCAS surgery;
- vehicle or drug treatment;
- cerebral blood flow measurements using a laser-doppler flowmeter;
- thinned skull cranial window;
- in vivo 2-photon imaging;
- behavioural tasks (Y-maze alternation task, Object Location task, Barnes Maze test);
- perfusion +/- fixation for histology and flow cytometry.

In vivo/Ex vivo imaging:

The thinned skull cranial window performed on transgenic reporter mice that will express fluorescent probes in microglia and neurons (Cx3Cr1-GFP x Thy1-YFP) will allow the study of the vascular, microglial and neuronal compartments over time as follow:

- The cortical vasculature will be visualized after the injection of a chemical dye which should not leaked from the lumen to the brain parenchyma due to its size. The presence of the dye outside of the vasculature will indicate a dysfunction of the blood brain barrier. Leakages will be imaged and quantified;
- Microglia behaviour: density and morphology such as cell volume, length of microglial processes, distance from vessel/leakage;
- Neuronal integrity: axonal degeneration.

Ex vivo imaging of the isolated brains will allow further investigations within the whole brains using 3D histology (acute and chronic timepoints).

Behavioural tasks:

A set of behavioural tasks will be performed after the sham/BCAS surgeries (acute and chronic timepoints):

- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task¹⁵;
- short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location

Task¹⁵;

- Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test³ (only chronic timepoint).

Sacrifice:

Sham and BCAS mice will be sacrificed at both acute and chronic timepoints for brain extraction, microglia isolation and flow cytometry work. Using microglial/macrophage specific markers, the phenotype of microglia cells will be characterized and compared between groups.

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.

3.4.3 Planning – coherence

The steps of the project are shown in Figure 1.

- The first cranial window in vivo imaging session will be done before the induction of hypoperfusion or sham procedures in order to collect baseline data for later comparison with the next timepoints;
- The treatment (or vehicle) to interfere with microglial function/presence will be performed before the induction of hypoperfusion as well to be able to understand the impact of microglia at both acute and chronic timepoints of hypoperfusion;
- The cerebral blood flow (laser Doppler) will be assessed at the baseline before induction of hypoperfusion, right after the surgery to guarantee the efficiency of the surgical procedure, and at each timepoint of the study:
- Acute timepoint: few days after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;
- Chronic timepoint: approximately 1 month after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;

Coherence

After induction of cerebral hypoperfusion, the integrity of the BBB is expected to be altered, leading to leakages of blood components/cells to brain parenchyma. Subsequently microglia will become activated to phagocyte the components that invade the brain. This acute hypoperfusion combined with acute microglial activation is expected to have a limited impact (as for amplitude and localization) on neuronal viability/function, with a cognitive dysfunction limited to working memory. However, following a chronic hypoperfusion, the BBB damage is expected to be more extended and associated with a deleterious microglial phenotype with exaggerated pro-inflammatory actions. As a consequence, neuronal injuries may take place in multiple cognitive domains leading to subsequent deficits in short and long-term memory tasks. By modulating microglial density and/or activity in the treated groups, the pro-inflammatory profile due to microglia is expected to decrease, affording therefore neuroprotection and a maintained cognitive function in this disease model.

Although cranial window imaging technique offers temporal resolution, it is limited to cortical areas. Therefore immunohistochemistry studies at both acute and chronic timepoints will be performed on whole brains to further investigate the brain pathological changes in deeper areas. Furthermore flow cytometry of brain tissues will offer complementary phenotypic informations (markers of activation) on microglial populations at both timepoints.

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	Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. MAASTRICHT UNIVERSITY
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

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.

The type and sequence of the animal procedures is summarized in the figure 1 and listed below. Ten animal groups will undergo these procedures (Pilot Sham, Pilot BCAS, group 1a, group 1b, group 2a, group 2b, group 3a, group 3b, group 4a, group 4b):

Groups	Pilot		1 (a&b)	2 (a&b)	3 (a&b)	4 (a&b)
Goal	Optimization		Experimental groups			
Surgery	Sham	BCAS	Sham	BCAS	Sham	BCAS
Treatment	No		Vehicle	Vehicle	Treatment	Treatment
Timepoints	Acute & chronic		Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)

Only male mice will be studied as sex differences have been reported for microglial activation¹⁻³ but also cognitive impairment disorders⁴. Sex-specific differences in gene expression have been observed in resting microglia that may lead to a differential response upon exposure to a trigger. This has been confirmed in studies showing a differential microglial activation during stress and hypoxic conditions¹⁻³. It is therefore very likely that the microglial response to BCAS may differ between genders. Because the inclusion of both genders may increase the variability, thus decrease the statistical power and limit the interpretation of the data, only male mice will be included in this study.

List of animal procedures:

Drug treatment

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The reporter mice will be treated with a drug either to deplete microglia cells or to decrease their activation. One possible therapeutic intervention is the depletion of microglial population via inhibiting CSF1 receptors (e.g. PLX5622). This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals^{5,6}. The dose of the treatment will be selected based on published animal studies that have shown evidences for its efficiency and its toxicological safety. It will be administered throughout the whole study period (in food pellets or drinking water) to investigate the contribution of microglia cells to hypoperfusion-induced vascular dementia.

Cranial window surgery and imaging

The reporter mice will undergo a thinned-skull cranial window surgery.

This minimally invasive procedure consists of the thinning of the skull in a small area to allow the visualisation of vessels, microglia and neurons below the skull surface, without opening of the cranial box thanks to two-photon microscopy.

This technique will allow the chronic imaging of:

- the cerebrovascular permeability (permeability to injected fluorescent probes);
- the microglial behaviour (density, cell volume, location);
- the neuronal integrity (axonal integrity of cortical neurons).

In vivo brain imaging sessions will be performed before the induction of cerebral hypoperfusion, soon after the induction of hypoperfusion (1-3 days) and after a longer period (c.a. 4-5 weeks). This will give new insights into the pathology development over time.

Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS)

This well-established procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced with 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm^{7,8}.

Cerebral Blood Flow (CBF) measurements

The efficacy of the BCAS procedure will be assessed by the measurement of the CBF before the narrowing of the CCAs, right after the surgical procedure as well as at several time points throughout the studies to follow the severity of the hypoperfusion in each individual animal. CBF measurements will be achieved by using a trans-cranial laser Doppler flowmeter. The laser-doppler probe will be glued on the skull surface for a short time period allowing recording of the CBF.

Cognitive evaluation

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery at both acute and chronic timepoints.

- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task⁹;
- short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location Task⁹;

- Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test⁸ (only chronic timepoint).

Hypoperfused animals show an impaired working memory after cerebral hypoperfusion for 1 month while reference memory is only impaired after cerebral hypoperfusion for 5-6 months^{7,8}. The protective or deleterious contribution of microglia cells on the cognitive functions of the animals will be determined in the treated groups.

Perfusion and sacrifice

Treated and non-treated sham/BCAS animals will be perfused and euthanized for the collection of brains that will serve for ex vivo investigations (2D and 3D histology, flow cytometry for the characterization of microglia phenotypes). While in vivo imaging limits the imaging to the first cortical layers of the brain, ex vivo imaging of the whole brains will provide more informations on the impact of cerebral hypoperfusion in deeper areas.

A first series of animals will be perfused and sacrificed at an early timepoint after induction of cerebral hypoperfusion. A second series of animals - imaged in vivo at both acute and chronic timepoints - will be perfused and sacrificed at the late timepoint after in vivo imaging. During the perfusion step, several fluorescent dyes will be injected to assess the integrity of the blood brain barrier.

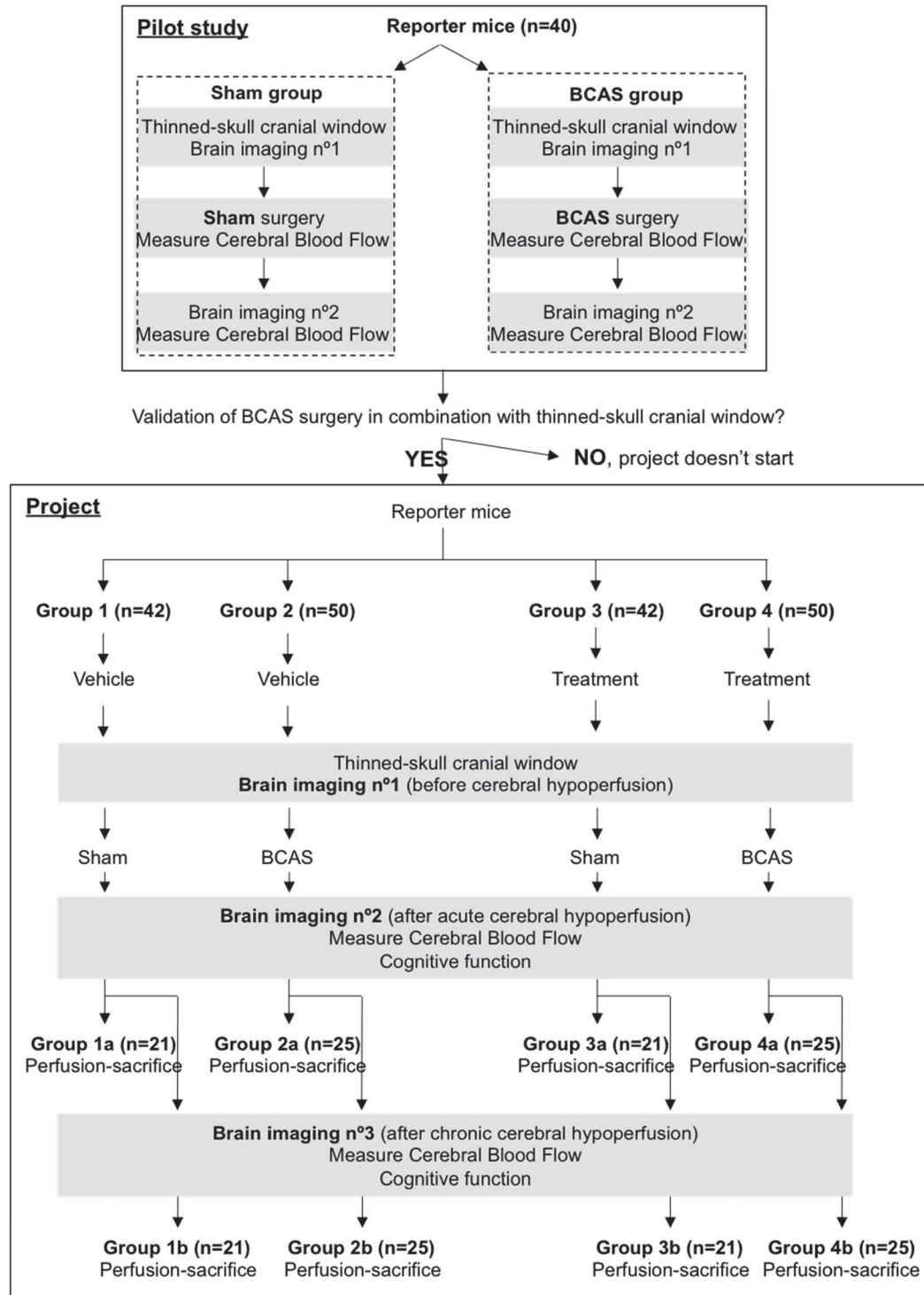


Figure 1: General design of the experimental procedures

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

Total duration

Maximal experiment duration for one animal (chronic hypoperfusion situation): 6 weeks (one week with cranial window prior BCAS surgery, maximum 5 weeks after BCAS surgery).

Animal procedures

All the animal procedures with their respective natures and frequencies are listed in the table below. A short description of the main procedures is described in the table below

Procedure	Nature	Frequency	Justification
Body weight measurement and neurological scoring	Animal handling	1x/week	Animal welfare score sheet and humane endpoint
Drug treatment (see corresponding paragraph, e.g. CSF1R inhibitor ^{5,6})	Administration of a drug (food or water)	daily	Study the potential protection afforded by the drug
Thinned skull cranial window and TPLSM imaging (see description below the table)	Surgery Imaging	1x 4x	In vivo imaging to study the impact of cerebral hypoperfusion on vascular, microglial and neuronal compartments over time ¹⁰
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)	Surgery	1x	Induction of the pathology (cerebral hypoperfusion) ^{7,8}
Brain Laser Doppler flowmetry	Imaging	4 x	Assessment of the decrease of cerebral blood flow induced by the BCAS intervention, after surgery and prior to each imaging session. ⁷
Y-maze alternation task	Behavioral task	2 x	Assessment of working memory ^{9,11}
Object Location Task	Behavioral task	2 x 3 trials	Assessment of short and long term spatial memories ^{9,11}
Barnes Maze test	Behavioral task	4 trials x 5 days	Barnes Maze test ⁸
Perfusion and sacrifice	Terminal experimentation	1x	Collection of fixed and non-fixed brains for IHC and flow cytometry respectively

Thinned skull cranial window:

Transcranial two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) imaging of the cortex in living mice is a minimally invasive method, which allows repeated imaging of brain cells and vasculature at high optical resolution over intervals ranging from seconds to months. By creating a thinned-skull cranial window with skull thickness ~20 µm, it is possible to image fluorescently labelled structures located up to 300µm within the cortex using TPLSM. In the past several years, this transcranial imaging approach has been used to study the development and plasticity of synaptic connections, neuronal network activity, cerebral vasculature, amyloid plaques and the structure and function of microglial cells in the living intact cortex ^{10,12,13}. This is the most suitable technique for chronic in vivo imaging at a high resolution.

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)

Under surgical anaesthesia, a midline cervical incision will be performed. Both CCAs will be exposed and freed from their sheaths. The arteries will be gently lifted by sutures and placed between the loops of the microcoils just below the carotid bifurcation. The microcoils will be twined by rotating it around the CCAs. In the sham operation groups, CCAs will be exposed without placing microcoils. This technique has been proven to be effective to induce a moderate reduction of CBF (-30%) with a mortality of 15-20% and a cognitive dysfunction in the operated mice^{7,8,14,15}.

Y-maze alternation task

Each mouse will be placed in a randomly divided start arm of a Y-maze and allowed to freely explore the arena for 6 min. The number of arm entries and the locomotor activity will be recorded per mouse. A successful alternation, named « a triad », is made if the mouse visits all 3 arms of the maze consecutively. The alternation percentage will be calculated from the number of triads divided by the maximum possible alternations per mouse. This is a standard behavioural task to assess the working memory of rodents.

Object Location Task (OLT)

Short and long-term spatial memory will be tested using the OLT. Briefly, this 2-trial task consists of a learning (T1) and -test trial (T2). In T1 a set of two identical objects will be placed symmetrically in the middle of a circular arena, which can be freely explored for 4 minutes. After a short or long interval period spent in their home cage, the mice will be placed in the arena 4 minutes for T2, while one of the objects (right or left) will be moved to a different location (front or back) and all other stimuli will be kept the same. As rodents are naturally curious, they should spend more time exploring the moved object if they remember the previous location. The time spent exploring either object will be scored. Before the testing session, animals will be habituated to the empty arena, all objects and testing procedures for a period of 1 week. This is a standard behavioural task for the evaluation of both short and long-term spatial memories.

Barnes Maze test

This behavioral task assess the spatial learning and reference memory of the tested mice. It is based on the capabilities of mice to explore and escape through holes. Barnes maze consisted of a circular surface with many holes around the perimeter. An escape tunnel is located beneath one of the holes. After habituation to the experimental setup, mice will be trained to locate a hidden escape tunnel with the aid of visual cues. Mice will perform 4 trials per day for 5 consecutive days. The Barnes maze is similar to the Morris water navigation task, but does not utilize a strong aversive stimulus as reinforcement (stress induced by swimming). Since high levels of stress can influence the animal's performance, the Barnes maze is considered ideal for eliminating stress-induced confounds.

Perfusion and sacrifice

The following procedures will be applied depending on the animal serie:

- serie of animals for immunohistochemistry: under terminal anaesthesia, the animals will receive an i.v. perfusion of fluorescent probes to label the vasculature and assess the blood brain barrier permeability. After termination of the i.v. perfusion of probes, animals will be perfused with fixatives before decapitation and tissue collection;
- serie of animals for flow cytometry and molecular work: blood will be collected from the aorta until cardiac arrest of the animals. Saline solution will then be perfused before decapitation and tissue collection.

- **References are listed at the end of the box/part B.**

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

To determine group size, a statistical power calculation will be performed based on the Sachs' formula $n=2[(\alpha+\beta)^2 \times \sigma^2]/\Delta^2$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlin, Springer Verlag). This is to guarantee that the sample size, in the respective experimental setup, will guarantee the detection of a given variation (decided prior). Our calculations will be based on previous own studies and existing publications.

In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,...), thus limiting the total number of animals to be used to achieve the study aims.

B. The animals

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

Species: *Mus musculus*

Strains: Cx3Cr1^{GFP/WT} x Thy1^{YFP/0} mice resulting from the crossing of Cx3Cr1^{GFP/GFP} (Jackson Laboratory Stock number 005582) and Thy1^{YFP/0} (Jackson Laboratory Stock number 003782) will be used while they are in their adult life stage.

Cx3Cr1^{GFP/WT} have been widely used to follow microglia over time and investigate their contribution in many different pathological conditions^{13,16-18}, while Thy1^{YFP/0} were used to follow the process of neuronal degeneration over time^{16,19-21}.

Mice from the 2 strains described above will be crossed to obtain Cx3Cr1^{GFP/WT} x Thy1^{YFP/0}. Both separate strains as well as the crossed mice have been already bred locally and don't show any sign of discomfort. These crossed mice will offer thus the possibility to assess the impact of cerebral hypoperfusion on the microglial and neuronal states over time as well as their interplay during the development of the pathology.

Estimated numbers (see table below):

A first group of 40 animals is required for the optimization of the BCAS and cranial window techniques to be used with this animal model (pilot study). This is to ensure the success of the whole study.

The main goal of the pilot study is to implement the BCAS surgery locally. A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be also tested in combination with the cranial window surgery. The CBF reduction and the survival rate will be analysed and compared to the data from literature.

The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :

- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that does not exceed the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

For the BCAS experimental groups, taking into account the variability of the different measurements, the success rate of the surgical interventions (80-85%) and the 2 series of animals needed per group to collect fixed (immunohistochemistry of whole brains, 10 mice/group) and non-fixed tissues (flow cytometry on whole brain lysates, 10 mice/group), it can be estimated that a total of 25 animals per BCAS group and per timepoint (a + b) is required ((10+10)/0.8 = 25). For the Sham groups, the expected drop due to surgery being lower (5%), the total number of animals per Sham group and per timepoint is (10+10)/0.95 = 21.

The total number of animals requested for this project is summarized in the table below and is estimated to 224 mice over a period of 3 years.

Group n°	Goal	Surgery	Treatment	Sub-groups	Acute timepoint	Chronic timepoint	Estimated number of animals
Pilot	Optimization	Sham/BCAS	-		x	x	40
1	Experimental	Sham	Vehicle	1a	x		21
				1b		x	21
2	Experimental	BCAS	Vehicle	2a	x		25
				2b		x	25
3	Experimental	Sham	Treatment	3a	x		21
				3b		x	21
4	Experimental	BCAS	Treatment	4a	x		25
				4b		x	25
		Total estimated number of animals					224

References:

- Bollinger, J. L., Bergeon Burns, C. M. & Wellman, C. L. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. *Brain Behav. Immun.* **52**, 88–97 (2016).
- Crain, J. M., Nikodemova, M. & Watters, J. J. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult CNS in male and female mice. *J Neurosci Res* **91**, 1143–1151 (2013).
- Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D. & Liu, F. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation* **12**, 32 (2015).
- Li, R. & Singh, M. Sex Differences in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Front Neuroendocrinol* **35**, 385–403 (2014).
- Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82**, 380–397 (2014).
- Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12**, 139 (2015).
- Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35**, 2598–2603 (2004).
- Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41**, 1278–1284 (2010).
- Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34**, 319–337 (2013).
- Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J. & Gan, W.-B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* **5**, 201–208 (2010).
- Akkerman, S. *et al.* Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav. Brain Res.* **232**, 335–347 (2012).
- Drew, P. J. *et al.* Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat. Methods* **7**, 981–984 (2010).
- Lou, N. *et al.* Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 1074–1079 (2016).
- Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38**, 2826–2832 (2007).
- Gooch, J. & Wilcock, D. M. Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID). *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 233–239 (2016).
- Evans, T. A., Barkauskas, D. S., Myers, J. T. & Huang, A. Y. Intravital Imaging of Axonal Interactions with Microglia and Macrophages in a Mouse Dorsal Column Crush Injury. *Journal of Visualized Experiments* (2014). doi:10.3791/52228
- Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4106–4114 (2000).
- Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155**, 1596–1609 (2013).
- Feng, G. *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of

GFP. *Neuron* **28**, 41–51 (2000).

20. Greenberg, M. L. *et al.* Two-photon imaging of remyelination of spinal cord axons by engrafted neural precursor cells in a viral model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E2349–2355 (2014).

21. Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C. & Clascá, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* **1345**, 59–72 (2010).

22. Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. & Hu, X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* **26**, 627–634; discussion 635 (1995).

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:

Our study focuses on the interplay of 3 cellular compartments over time in presence or absence of a proper cerebral perfusion. There is no in vitro alternative method for this study. In addition, the cognitive function will also be evaluated to assess the relevance of the study to the clinical situation. The use of an animal model is therefore mandatory to achieve the research aims.

Reduction:

The number of animals required per group is calculated, based on previous own studies and existing publications, to guarantee that the statistical power will be reached with the minimal number of animals. In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,...).

Refinement:

The mice to be used are transgenic animals that harbor fluorescent proteins in the cells of interest. This enables tracking of those cells in vivo and a better imaging quality than any staining or labeling technique. Thus the critical steps associated with staining/labelling will be avoided. Those mice will undergo a well-established surgical intervention to induce cerebral hypoperfusion. The BCAS model has been validated in several studies to induce a 30% CBF reduction (microcoils with a diameter of 0.18 mm^{7,8}) that is associated with cognitive dysfunction, and is therefore recognized as a relevant animal model for the study of vascular cognitive impairment¹⁵. The combination of this surgical intervention on the transgenic mice is the perfect combination to achieve the goals of the proposed study. In addition, several parameters will be collected from the same animals, thus allowing to better relate experimental observations within a same animal.

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

An adequate level of anesthesia will be induced to guarantee the absence of suffering during the surgical interventions. In addition, prior and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent suffering during the recovery from surgery.

Animals will be carefully examined throughout the entire duration of the study for the early detection of pain signs.

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.

n.a.

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.

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.

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

Welfare score sheets will be filled in for each animal and will be used throughout the entire duration of the study to ensure that the discomfort of the animals do not exceed the humane endpoints defined for the study (part J).

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- 1) As a result of the BCAS surgery, animals will exhibit a decreased cognitive function (expected);
- 2) Possible complications after cranial window surgery or BCAS surgery (e.g. damage to the cranial window caused by the animal: detachment of the dental cement border),;
- 3) Possible complications due to drug treatment due to an unknown toxicity.

Explain why these effects may emerge.

- 1) This effect is expected and is part of the pathology studied;
- 2) This effect might occur following the surgical interventions;
- 3) Although the treatment will be selected on different criteria including toxicological safety, it is not possible to predict the absence of toxicity in our particular model studied.

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

- 1) If the severity of the cognitive dysfunction leads to the humane endpoint described below (part J), the animal will be euthanized to avoid unnecessary pain or distress;
- 2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, a.o.) and a solution will be implemented to avoid future complications.
Surgeries will be performed with sterile tools in an aseptic environment to prevent the occurrence of infections. In case of a skin infection, the wound will be cleaned with an antiseptic and an anti-inflammatory drug will be administered to limit the associated inflammatory reaction. The infected animal will be monitored carefully and will receive a painkiller drug to avoid unnecessary pain. If the infection can't be controlled, the animal will be euthanized. In case the dental cement border of the cranial window is getting loose or has been detached by the animal, an administration of a painkiller will be done to avoid any unnecessary pain and a new dental cement protection will be created under anaesthesia.
- 3) If the toxicity observed leads to a discomfort exceeding the moderate discomfort expected for the study and/or if it impairs the interpretation of the data, the treatment will be interrupted and animals will be euthanized if humane endpoints are reached.

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.

Animals will be inspected regularly to monitor their welfare. The observations (body weight, overall condition, 18-points Garcia neurological score based on locomotor activity and body proprioception) will be registered in an animal welfare score sheet.

The Garcia neurological test will be used weekly to assess eventual motor and behavioral deficits

indicative of major neurological damage such as stroke. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum²².

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following BCAS surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described⁷;
- a Garcia score ≤ 10 (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will reflect a severe alteration of behaviour and locomotor activity due to a major cerebral injury.

Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized to avoid any unnecessary stress and pain using a CO2-euthanasia system.

Indicate the likely incidence.

The expected incidence is low (5%).

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').

Procedure	Expected level of discomfort (overall % of animals impacted)
Animal handling, and body weight measurement	mild (100%)
Drug treatment (water or food)	mild (50% - 3a, 3b, 4a, 4b)
Thinned skull cranial window surgery & imaging	mild (100%)
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS) or Sham	moderate (100%)
Consequences of BCAS	moderate (50% - Pilot, 2a, 2b, 4a, 4b)
Brain laser Doppler flowmetry (LDF)	mild (100%)
Y-maze alternation task	mild (100%)
Object Location Task (OLT)	mild (100%)
Barnes maze test	mild (50% - 1b,2b,3b,4b)
Cumulative discomfort – Pilot study	moderate
Cumulative discomfort - Experiment	moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The study required analysis of brains post-mortem.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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

AVD1070020172885

Bijlagen

1

Datum 11 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation" met aanvraagnummer AVD1070020172885. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus 2017 hebben wij vragen gesteld over het ongerief en de NTS. Bij uw antwoord heeft u een aangepast projectvoorstel en een aangepaste bijlage beschrijving dierproeven en NTS meegestuurd.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation" starten. De vergunning wordt afgegeven van 11 september 2017 tot en met 1 september 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 augustus 2017. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020172885

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).

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

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: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 11 september 2017 tot en met 1 september 2020, voor het project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation" met aanvraagnummer AVD1070020172885, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 augustus 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 augustus 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 augustus 2017, ontvangen op 7 augustus 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 23 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging				
	Muizen (Mus musculus) /	224	100% Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven 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 1 sub a 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.

Aanvraagnummer:

AVD1070020172885

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD1070020172885

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

Aanvraagnummer:

AVD1070020172885

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b 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.