

	Dossier: AVD11500202418345	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	3X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Op zoek naar oorzaken van behandelfalen na een herseninfarct
NTS-identificatiecode	NTS-NL-375219 v.1, 15-04-2025
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Herseninfarct Bloedvaten Gezondheid van het brein MRI Hoge bloeddruk
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Cardiovasculaire aandoeningen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Een herseninfarct is een verstoring van de doorbloeding van de hersenen waardoor deze ernstige schade oplopen. Jaarlijks worden meer dan 25,000 mensen in het ziekenhuis opgenomen met een herseninfarct, waar ongeveer 8500 mensen aan sterven. Er zijn twee behandelmethoden voor een herseninfarct, maar deze werken niet zo goed als we hadden gehoopt. Pakweg 50% van de patiënten blijft gehandicapt of overlijdt drie maanden na de behandeling, ondanks dat er aan de criteria van een succesvolle ingreep is voldaan. Soms wordt de beschadiging in het brein na de behandeling groter. Dit 'behandelfalen' is het onderwerp van dit project. Verondersteld wordt dat abnormale hersendoorbloedingsverschijnselen na de behandeling ('reperfusie') bijdragen aan behandelfalen.</p> <p>Onderzoek in ons voorgaande project heeft aangetoond dat er een breed scala aan unieke reperfusieverschijnselen bestaat, waargenomen na de behandeling, die de doeltreffendheid van de behandeling of het verdere ziektebeloop zouden kunnen beïnvloeden of verklaren. Kort gezegd zijn er een aantal factoren die het falen van een behandeling voorafgaan, waardoor de beroertepatiënt nooit beter wordt. We willen weten hoe dit kan gebeuren, bij wie dit gaat gebeuren, zodat we het daardoor kunnen behandelen/voorkomen.</p> <p>In deze voortzetting onderzoeken we de complexe relatie tussen het hersenweefsel, de hersendoorbloeding, en de stofwisseling van het hersenweefsel na een herseninfarct. Het vermoeden bestaat dat bepaalde veelvoorkomende aandoeningen onder de bevolking, zoals chronisch hoge bloeddruk, negatieve invloed op uitoefenen op de kans op herstel na een herseninfarct, en dat een dergelijke aandoening een belangrijke schakel is die tot behandelfalen kan leiden. Onduidelijk is hoe het proces dat leidt tot behandelfalen precies in elkaar zit, terwijl dit proces een belangrijk aanknopingspunt kan zijn voor nieuwe behandelstrategieën.</p> <p>Het is daarom van groot belang dat we de processen die leiden tot behandelfalen na een herseninfarct beter begrijpen. Wij gaan daarom onderzoek doen naar de oorzaken en gevolgen van behandelfalen. Daarnaast willen we weten of een nieuwe aanvullende therapie na een reguliere behandeling van een herseninfarct een therapeutisch effect heeft.</p> <p>Dit onderzoek gaan we uitvoeren door de effecten van een herseninfarct en daaropvolgend herstel van bloedtoevoer na te bootsen en te bestuderen in een levend dier. Dit gaan we meten met verschillende beeldvormingstechnieken, waaronder MRI-scans.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit	Dit project zal nieuwe inzichten verschaffen over de onderliggende ziekteprocessen van een herseninfarct in ratten, voornamelijk over de link tussen abnormale hersendoorbloeding en de

hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

stofwisseling van het weefsel. Met deze informatie kunnen we de huidige behandelingen voor mensen verbeteren of bijdragen aan nieuwe behandelmethode om zo het aantal patiënten dat herstelt na een behandeling te vergroten. Daarnaast zullen we aan de hand van verschillende MRI-uitkomstmaten de kans op behandelfalen proberen te voorspellen. Door het gebruik van deze techniek kan onze methode vertaald worden naar de kliniek en bijdragen aan een geïnformeerd besluit over het wel of niet starten van een bepaalde behandeling in een patiënt met een infarct.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>In dit project worden vier modellen voor menselijke aandoeningen gebruikt. Het betreft verschillende combinaties van:</p> <p>Nabootsen van een herseninfarct door middel van:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Het tijdelijk afsluiten van bloedvat met een draadje 2) Het tijdelijk afsluiten van bloedvat met een embolus/emboli (zoals afkomstig van een bloedprop) <p>...gecombineerd met modellen voor chronisch hoge bloeddruk:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Van erfelijke oorzaak b) Hoge bloeddruk die veroorzaakt wordt door een kleine ingreep <p>Voor modellen (1), (2), en (b) worden de dieren onder narcose geopereerd en ontvangen ze pijnstilling.</p> <p>In alle studies wordt MRI gebruikt om belangrijke ziekteprocessen te meten. Hiervoor worden de dieren drie tot acht keer onder narcose gebracht en in een MRI-apparaat geplaatst. Een meting duurt maximaal 2,5 uur.</p> <p>Aanvullend worden de dieren blootgesteld aan injecties en wordt het gedrag bestudeerd, om de gevolgen voor het brein vast te stellen.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Wij verwachten 7% terminaal ongerief, 15% mild ongerief, 64% matig ongerief en in maximaal 14% van de ratten ernstig ongerief. Net als bij mensen zien we in de modellen voor herseninfarct veel variatie met betrekking tot de mate van de hersenschade. Dit volume van de hersenschade hangt samen met het ongerief. In voorgaande projecten hebben we vastgesteld dat doorgaans 20% van de ratten een bepaalde mate van hersenschade oploopt die in de categorie 'ernstig ongerief' valt.</p> <p>De dieren met een herseninfarct kunnen tot 20% van hun lichaamsgewicht verliezen in de eerste dagen na een herseninfarct. Daarnaast kunnen de dieren tijdelijk minder actief zijn.</p> <p>Verder kan er licht ongerief ontstaan door:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Het inleiden van en bijkomen uit verdoving, nodig voor de operaties en MRI-metingen. - Gedragstudies: we nemen enkele korte gedragstesten af om het functioneren van de ratten te beoordelen. - In een deel van de studies krijgen dieren een experimentele behandeling toegediend, deze moet mogelijk ingespoten worden onder lichte verdoving. Van de behandeling zelf verwachten we geen bijwerkingen. <p>Terminaal ongerief kan ontstaan door het starten van experiment onder verdoving waar het dier niet meer uit wakker zal worden.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1" data-bbox="416 1637 1557 1872"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</td> <td>1523</td> <td>100</td> <td>222</td> <td>981</td> <td>220</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	1523	100	222	981	220
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	1523	100	222	981	220												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1" data-bbox="416 1895 1557 2085"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na</p>	<p>Alle ratten worden aan het eind van het experiment gedood om nader onderzoek te verrichten aan het (hersens)weefsel. Dit is noodzakelijk om de omvang van de schade, veranderingen in</p>																

de procedure.

vaatstructuur en de aanwezigheid van stolsels nader te bepalen.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

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

Dit onderzoek zal informatie verschaffen over het beloop van een herseninfarct. Deze informatie kan niet ingewonnen worden met patiëntenstudies. MRI kan weliswaar uitgevoerd worden op patiënten met een herseninfarct, maar niet op de kritieke momenten waar informatie nodig is (tijdens of vlak na de herseninfarct). Het gebruik van diermodellen is een oplossing voor dit probleem.

Daarnaast wordt er vooronderzoek gedaan naar nieuwe medicijnen die het herstel na een herseninfarct kan verbeteren. Op basis van dit vooronderzoek starten wij een proef naar de effectiviteit in een levend organisme (rat). Door deze gang van zaken hebben we uiteindelijk minder ratten nodig om wetenschappelijke en klinische vragen te beantwoorden.

Modellen waarbij onderzoek wordt uitgevoerd buiten de biologische context van een levend wezen, zoals organoïden (of orgaantjes op een chip), missen vaak de aanwezigheid van een bloedstroom, een bloeddruk, en een mogelijk verband tussen alle betrokken cellen (interacties) die normaal voorkomen in ons hersenweefsel. Ook is er geen mogelijkheid voor het bepalen van de gevolgen voor het brein op gedragsniveau. Een levend wezen is méér dan de optelsom van onderliggende onderdelen, daardoor zal het testen van een aanname (bv. voor nieuwe medicatie) op enkel in vitro-modellen een incompleet beeld leveren.

2. Vermindering

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

- 1) We maken gebruik van meerdere keren beeldvorming (MRI) voor iedere rat. Deze techniek kan afbeeldingen maken van de organen (zoals het brein) van een levend wezen, en stelt ons in staat om in één dier het verloop van de herseninfarct en de onderliggende processen te volgen. Hierdoor hebben we minder dieren nodig om vraagstukken te beantwoorden.
- 2) We hebben een serie go/no go-beslissingen en selecties ingebouwd om de geplande studies bij te sturen. Als een bepaalde techniek of interventie niet effectief blijkt of een bepaalde experimenten geen nieuwe bruikbare informatie opleveren, dan gaan we niet verder met onderzoek in die richting.
- 3) We hebben vaardige onderzoekers in dienst zodat uitval beperkt blijft.
- 4) We houden ons aan de in dit veld strak omschreven internationale protocollen om de uitval zo klein mogelijk te houden.
- 5) We voeren kleine teststudies uit om de experimentele omstandigheden te optimaliseren.

3. Verfijning

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

Ratten worden al tientallen jaren ingezet voor onderzoek naar herseninfarcten, omdat de onderliggende processen, zoals het afsterven en herstellen van hersencellen, bij ratten vrijwel hetzelfde zijn als bij mensen. Door deze lange geschiedenis is er veel kennis over hoe we studies naar de gevolgen van een herseninfarct in de rat moeten uitvoeren, en de mate waarin de uitkomsten overeenkomen met wat er gebeurt bij de mens. Dit heeft ertoe geleid dat dit diermodel een zeer verfijnde methode is voor een herseninfarct. Er zijn richtlijnen voor de beste aanpak ('best practices') voor het opwekken van de herseninfarct, voor het volgen van de ratten na de ingreep, pijnbestrijding, en het kiezen van eindpunten om ongerief te beperken.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We kiezen voor ratten omdat we hier veel ervaring mee hebben. De protocollen voor deze studies op ratten zijn uniform en consistent, en door vele onderzoeksgroepen wereldwijd gebruikt. We kiezen specifiek voor een soort rat dat veel gebruikt wordt voor dit soort onderzoek. Ook kiezen we een betrouwbaar model voor een vaatandoeningen die veel voorkomt onder de menselijke bevolking. De ratten zijn minstens twee à drie maanden oud, dus (jong)volwassen, zodat ze voldoende uitontwikkeld zijn voor onze doeleinden. We willen ook oudere dieren gebruiken om na te gaan in hoeverre de gevolgen van een herseninfarct en de onderliggende processen en mechanismes veranderen met veroudering. Deze experimenten doen we omdat een herseninfarct veel voorkomt bij oudere mensen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	28-02-2031
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 7.10.202503211525 (d5afd5c)Version date: 2025-03-21 15:25:31

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy policy](#) | [Legal notices](#) | [Accessibility](#)



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <input type="text" value="11500"/>			
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen			
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3			
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1			
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2			
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht		
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam
			██████	██	██████
					<input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl		
		Titel, voorletters en achternaam van diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam
			n.v.t.		
					<input type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde			
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat- en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht		50
		Postcode en plaats	3584CJ	UTRECHT	
		Postbus, postcode en plaats	80.125	3508TC	UTRECHT
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	██████████		
					<input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		Functie	██████████		
		Afdeling	Translational Neuroimaging Group		
		Telefoonnummer	██████████		
		E-mailadres	██████████		

1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	██████████	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
	Functie	██████████	
	Afdeling	Translational Neuroimaging Group	
	Telefoonnummer		
	E-mailadres	████████████████████	
1.6 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
	E-mailadres		
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569	
	E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl	
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag		
	<input checked="" type="checkbox"/> Nee		

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01-10-2024
	Einddatum (t/m)	
3.2 Wat is de titel van het project?	The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke: CONTRAST 2.0	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Op zoek naar oorzaken van behandelfalen na een ischemische beroerte.	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
	Postadres	Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT
	E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

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

Naam: UU-ASC		Afdeling:	
Straat:			Huisnummer:
Postcode:	Plaats:		
Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT	
E-mail: asc.factuur@uu.nl			

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

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 3
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
Overige bijlagen, indien van toepassing	
<input type="checkbox"/> Melding machtiging	
<input type="checkbox"/>	

6 Ondertekening

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

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

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

Naam	
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	
Handtekening	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
		1	Revealing determinants of futile recanalization with MRI in animal models of stroke

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.

An overview of the experimental approach, including its primary and secondary outcome parameters, is shown in Figure 1.

The **purpose** of these procedures is to identify causes and consequences of futile recanalization in rat models of stroke by studying the contribution of **1)** selected key epidemiological factors such as sex, comorbidity, and treatment strategy, and **2)** the role of intermediating effects of [redacted] and [redacted] on lesion evolution (primary outcome). Hypotheses are spelled out in the main proposal under 3.2.1.

Below, we have outlined several animal models of stroke that recapitulate key features of the disease that associate with futile recanalization. Together, studies with these models will contribute towards an integrative understanding of futile recanalization and how we may prevent it.

As described in the main proposal, in each model we pursue a series of research questions (RQs):

1. Training and optimization of models and experimental workflow

2. How does recanalization after stroke affect lesion evolution (futile recanalization)?
3. Does lesion evolution coincide with [REDACTED] abnormalities after stroke?
4. Do these [REDACTED] abnormalities coincide with perturbations in MRI markers of brain health?
5. Do these observations (RQ2-4) depend on risk factors incorporated in the model?
6. What are the underlying cellular/molecular mechanisms?
7. Can we improve outcome (avert futile recanalization) by therapeutic intervention?
8. What is the best timing and dosage for such intervention?
9. Does the efficacy of the intervention depend on risk factors incorporated in our model?

Experimental design and timeline

Experimental methods

We will employ two stroke models which recapitulate various degrees of recanalization and reperfusion efficacies. These factors pertain to the futile recanalization phenomenon.

1. Transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) with an intraluminal filament.
2. Embolic model with gradual recanalization by thrombolysis.

Researchers in the field are currently also working on novel rat models for thrombectomy. In recent years, there has been increasing interest in developing awake stroke models, because there is a growing body of evidence demonstrating that anesthesia during stroke can mediate disease outcome (Hoffmann et al., 2016; Franx et al., 2024c). The field is pushing to develop awake stroke models, although there hasn't been much progress yet. In case of a breakthrough, we might replace one of the models above with a novel awake stroke model (conditions apply, details can be found below under "D: animal models of stroke").

Hypertension was identified over the course of CONTRAST 1.0, partly due to our own work, as potential determinants of persistent cerebral perfusion deficits after stroke treatment (Cipolla et al., 2018; [REDACTED]). We will combine the abovementioned methods of stroke induction with two models of hypertension:

1. Genetic hypertension (model of primary hypertension in humans)
2. Induced hypertension (model of secondary hypertension in humans)

Final selection of models for interaction studies of stroke and hypertension

Taken together, we combine two stroke models with two hypertension models to investigate, in four different studies, the interaction of stroke and hypertension etiologies:

- Study 1 = intraluminal stroke & primary hypertension
- Study 2 = intraluminal stroke & secondary hypertension
- Study 3 = embolic stroke & primary hypertension
- Study 4 = embolic stroke & secondary hypertension

Cofactors

We will include several important predispositions known to affect stroke outcome in clinical populations in our experimental models as cofactors:

- *Stroke etiology-related predisposition*, by which we mean features of stroke etiology that can be modeled in the lab:
 - *Occlusion time* (which recapitulates "time-to-reperfusion" in the clinic) is known to affect likelihood of good outcome and is expected to interact with the brain's ability to recover from the ischemic event. Occlusion times between 30 – 180 minutes will be chosen. We will choose max 3 different occlusion times as conditions for our studies. Each rat gets only one ischemic stroke (occlusion).
 - *Embolus types*: it is known certain types of emboli are resistant to recanalization therapy. To investigate how different embolus compositions contribute to embolus (clot) resistance and futile recanalization, we will prepare

different emboli and inject these according to standards of the thrombo-embolic model and enrich them with factors to resemble clot phenotypes found in human studies. We will investigate a maximum of 3 embolus types.

- **Sex:** ischemic stroke is a sexually dimorphic disease, and including both sexes is important to increase translational value of preclinical studies (Ahnstedt et al., 2016). [REDACTED]
- **Aging** is another important risk factor for futile recanalization (Deng et al., 2022). Aging and hypertension likely interact to aggravate stroke outcome, and it may be relevant to model them together. We will buy aged rats or acquire young ones that we will age naturally at our institute. The stroke surgery will become more difficult to complete due to the aging process, which increases adiposity of the animal and renders the vasculature more brittle, increasing the risk for complications. We will first train the stroke model on aged rats in pilot 1b (see below), and if successful, only then will we apply it in a main study (**go/no-go**).

Outcome parameters of main studies

Primary outcome measure

The primary outcome parameter will be MRI-derived lesion evolution at the whole-brain level.

Secondary outcome measures

The secondary outcome measures are MRI-derived imaging markers of [REDACTED] and [REDACTED] activity. Additional outcome measures will be cerebrovascular activity (important indicators of vessel function), behavioral test scores and post-mortem tissue features. These will be related to the primary outcome parameter.

Justification of outcome parameters

The choice of outcome parameters is based on lack of data and understanding of futile recanalization in stroke. We expect that futile recanalization manifests itself through malignant lesion evolution, which may not resolve or even grow after recanalization therapy is applied, and we [REDACTED] MRI allows us to track the size and severity of the lesion, precisely and non-destructively over an extended period of time, and therefore enables the quantification of lesion evolution. New MRI-derived imaging markers of [REDACTED] and [REDACTED] or cerebrovascular activity represent secondary outcome parameters can give us new insights into why tissue recovers or infarcts after a certain amount of time. The behavioral outcomes and ex vivo tissue assays are included to verify/validate our in vivo imaging findings and estimate consequences for functional outcome.

Pilots (RQ1)

Pilot 1a: Before these experiments we need to develop and test MRI protocols for in vivo monitoring of the primary and secondary outcome parameters, i.e., the MRI markers of interest (outlined in the next text box).

Pilot 1b: We need animals to train our research technician(s) in methods of inducible hypertension, which necessitate microsurgery depending on the model.

Pilot 1c: Furthermore, we need to be sure our technician(s) are adequately trained to perform the microsurgeries required for the animal models, but we emphasize that animal models of stroke described herein are already established in our lab. Nevertheless, we still need to reserve a number to make sure training can be performed in case of model developments or personnel turnover. We expect that a few animals, if any, will be needed in this pilot.

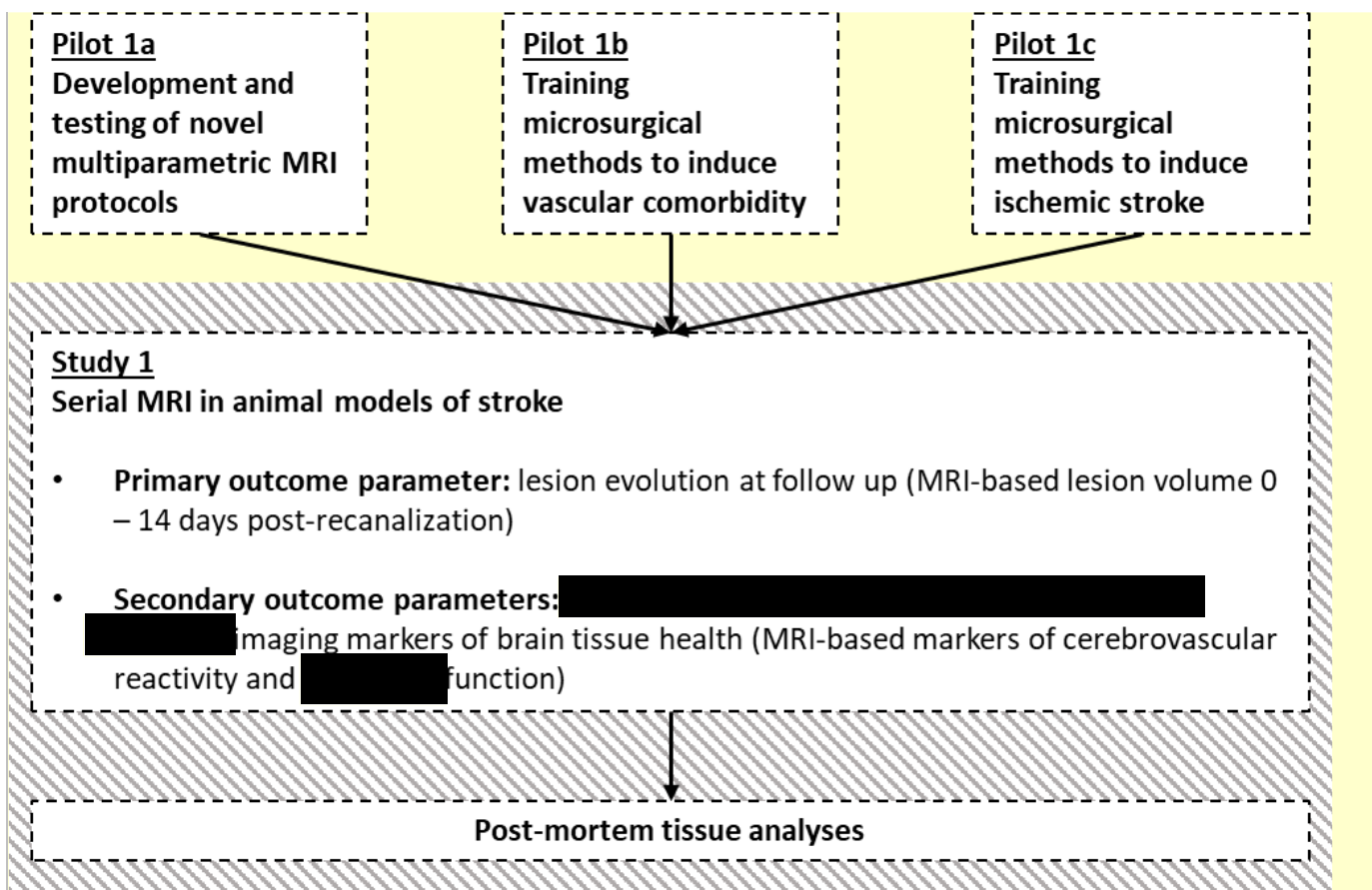


Figure 1. Overview of primary study 1 and preparatory pilot studies. MRI = magnetic resonance imaging

General timeline

Each rat for each of the four studies specified above will go through at least several of these steps. We will induce stroke and recanalization in every rat; every model converges on these two steps, which are shown in **bold**, but exact timing of other steps surrounding these common procedures (e.g., MRI sessions and/or administering intervention) depend on what determinant or intervention on stroke outcome is being studied. The majority of the animals undergo procedures A-B-C-D-G.

Table 1: general experimental timeline

Time (days)	Code	Details
[-37 ... -7]	A	Arrival at facility & habituation
[-30 ... -7]		A1: Induction of hypertension (RQ5: Study 2 or Study 4 only)
[-1 ... -3]	B	B1: Baseline behavior
[-1 ... -3]	C	Possible baseline MRI (one session, 2.5h maximum, general anesthesia and contrast agent injection)
-1	F(1)	Possible sacrifice of post-mortem group (RQ6)
-1	D	Stroke: obtain blood to generate embolus (Study 3 or 4 only)
0	D	Stroke: induction (once) Large vessel occlusion D1: intraluminal filament model (occlusion) D2: embolic model (occlusion)
0	C	MRI during occlusion, (one session, 2.5h maximum, continued general anesthesia and contrast agent injection)
0	F(1)	Possible sacrifice of post-mortem group (RQ6)

0	E	Possible intervention (RQ7-9)
0	D	Stroke: recanalization (once) D1-r: intraluminal filament model (filament retraction) D2-r: embolic model (lysis by clinically approved thrombolytic)
[0 ... 14]	E	Possible intervention (RQ7-9)
[0 ... 14]	B	<u>Behavioral testing</u> (min 1, max 6 test batteries, max 3 session/week)
[0 ... 14]	C	Post-recanalization <u>MRI sessions</u> after recanalization (min 1, max 3 sessions, max 2.5h/d, max 3 sessions/week; MRI includes general anesthesia and contrast agent injection)
[0 ... 14]	F(2)	Possible sacrifice of post-mortem group (RQ6, before final study endpoint)
[0 ... 14]	G	Sacrifice (RQ6, final endpoint)

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

A1: Animal models of hypertension

In the upcoming study, we will improve our understanding about the interaction of hypertension with futile recanalization and poor reperfusion (Cipolla et al., 2018; Franx et al., 2024a).

Animal models of hypertension can be distinguished by genetically inherited or induced hypertension, which represent primary and secondary hypertension respectively (Lerman et al., 2019). In these studies, we will choose one model of primary and one of secondary hypertension, this comorbidity will be combined with a model for ischemic stroke.

- *Primary hypertension: genetic model*

A common way to study primary hypertension is to use a rat strain that exhibits genetic (inherited) hypertension. we choose the spontaneous hypertensive rat (SHR) or Dahl salt-sensitive rat (DSS): The former develops high blood pressure spontaneously and is widely used in the field (Lerman et al., 2019), the latter strain needs a trigger by high-salt diet, which can be representative of certain Western-style diets that associate with hypertension and stroke (Lerman et al., 2019). Both models are well-established and lead to increased blood pressure, kidney damage and vascular remodeling processes.

Control groups will consist of rats with similar genetic background but without the hypertensive phenotype. Genetic hypertension is “self-induced” and does not require invasive procedures, therefore the expected discomfort in both models is equally mild.

- *Secondary hypertension: induced models*

The models of induced hypertension represent secondary (malignant) hypertension where pathogenesis is attributable to renal, vascular and/or endocrine damage. One common method to induced hypertension is the two-kidney one clip method. In this model, one renal artery is partially constricted using a clip, reducing blood flow to one kidney, which triggers the release of renin and activates the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). This leads to increased production of angiotensin II and aldosterone, causing blood vessel constriction and fluid retention, raising blood pressure. pertinent to stroke outcomes (Miksche et al., 1970). Another model under consideration is the long-term subcutaneous infusion of angiotensin II, which leads to systemic vasoconstriction and increased blood pressure. This also stimulates the release of aldosterone, causing sodium and water retention, further raising blood pressure. The model mimics the effects of overactivation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). (Lerman et al., 2019). We expect that, because renovascular clipping requires a single invasive procedure and repetitive angiotensin II infusion requires many mild-invasive procedures – either induction method leads to roughly equally moderate discomfort. Control groups for secondary hypertension will be naïve rats of the same strain.

For both primary and secondary hypertension, we will pick one model to continue the studies with. We will discuss which model is the most adequate, and how to set up these models, with experts in the field which model of hypertension.

B: Behavioral testing (max 5x test batteries per animal)

Behavioral testing is relevant to the validation of ischemic injury and treatment effects. There is a wide variety of reliable behavioral tests available that can assess behavioral and functional deficits after stroke. We will consider several behavioral tests from this set that together form a battery to assess sensorimotor deficit (e.g.: sticky dot removal test, forelimb asymmetry, corner test, beam walk, grip strength, Rotarod, unforced locomotion gait test, pellet reaching test, neurological deficiency score) and cognitive (e.g.: Barnes maze, novel object recognition) and psychological impairments (e.g.: open field test). All these tests are already established in our lab. The most appropriate combination of these tests will be selected; some tests are more sensitive but can be prohibitively time consuming. They are expected to induce no more than a mild level of stress. Based on our experience from CONTRAST 1.0, the most likely choice is the neurological deficiency score and pellet reaching test, these tests are similar to tests used in clinical settings and have high face validity.

We note that the pellet reaching test, beam walk test, unforced locomotion gate test and Barnes maze require training sessions in order to improve test compliance. If these tests are selected, up to three training sessions (one per day) are included before the baseline experiment. In addition, the pellet reaching test requires a fasting period of 12h at maximum for test compliance. As mentioned, these tests induce no more than a mild level of stress. This is initially caused by handling but subsides over time as the rat habituates to the researcher.

C: MRI sessions

As explained in the proposal, we will use MRI to investigate imaging markers of brain function and health to elucidate causes and consequences of futile recanalization (RQ 2-5). Each MRI session contains a basic set of experiments to generate images of the rat brain, such as diffusion-weighted MRI. Other than that, the animal has to be anesthetized to ensure compliance for MRI (movement disturbs data acquisition). MRI sessions meant to acquire data during occlusion and immediately after recanalization will be conducted without discontinuation of anesthesia. MRI experiments are non-invasive, but there are a few exceptions: some experiments require a minimally invasive procedure during scanning. During these experiments, which are motivated in the main proposal (under "Strategy"), animals can receive:

- an intravenous injection of a contrast agent to enhance the signal of the blood (max 1x per animal per MRI session). We use this to directly measure [REDACTED] and blood-brain barrier permeability.
- a hypercapnic gas challenge, meaning that the anesthesia gas-mixture will be adjusted to 10% CO₂ or 10% O₂, but carbogen may also be used. This is used to evaluate cerebrovascular reactivity, or the ability of the vessels to dilate or constrict (max 1x per animal per MRI session).
- an intravenous injection of paramagnetic micro-meter sized iron oxide beads necessary to perform molecular MRI
- an intravenous injection of deuterated glucose to monitor active [REDACTED] With this technique, we can study anaerobic glycolysis in cells (De Feyter et al., 2018; Straathof et al., 2021).

After stroke surgery, MRI sessions are repeated to track the effects of our manipulations on outcomes in the brain, repetitive MRI sessions require reinduction and maintenance of general anesthesia. Each MRI session will take 2.5 hours at maximum.

D: Animal models of stroke

- **D1: Intraluminal filament model**

This method uses intra-arterial access to occlude a cerebral artery. It involves introducing a silicon-tipped nylon thread into the extracranial internal carotid artery, which is advanced until its tip occludes the middle cerebral artery (MCA; Fig 2) (Zea Longa et al., 1989). If the procedure is successful, occlusion leads to a perfusion deficit (hypoperfusion) in the tissue irrigated by the MCA. After a predetermined amount of time, the filament is retracted to allow recanalization (D1-r). The occlusion of the middle cerebral artery accounts for approximately half of all ischemic stroke etiologies (Banerjee and Chimowitz, 2017). It has been argued that this model is the best option for mimicking the ischemia-reperfusion dynamic of mechanical thrombectomy (Sutherland et al., 2016).

- **D2: Embolic model**

This method can be regarded as a modified version of the Longa model. Instead of a filament, an embolus such as a homologous or autologous is prepared and injected close to the terminus of the middle cerebral artery (Zhang et al., 1997). Various types of emboli have been introduced over the years (van der Wijk et al., 2019). The surgical technique

employed to reach this artery is nearly identical to the filament model. When generating blood clot emboli we will obtain a few drops of blood from the same animal (depending if autologous or homologous embolus is desired) once within one day before stroke induction. This blood will be used to create an embolus that will be treated with a thrombolytic. At the day of stroke induction, the embolus will be injected at the level of the proximal MCA via a catheter. Recanalization is induced by intravenous administration of a thrombolytic drug (**D2-r**). Compared to the intraluminal filament method, reinstatement of blood flow in this model is more gradual (Fig 2), and it can be argued that this model is closer to clinical reality. Embolic stroke models are accompanied by a risk of fragmentation or incomplete lysis of the injected embolus, and thus persisting hypoperfusion after a recanalization attempt, which is a complication seen in human stroke patients and a possible explanation for futile recanalization.

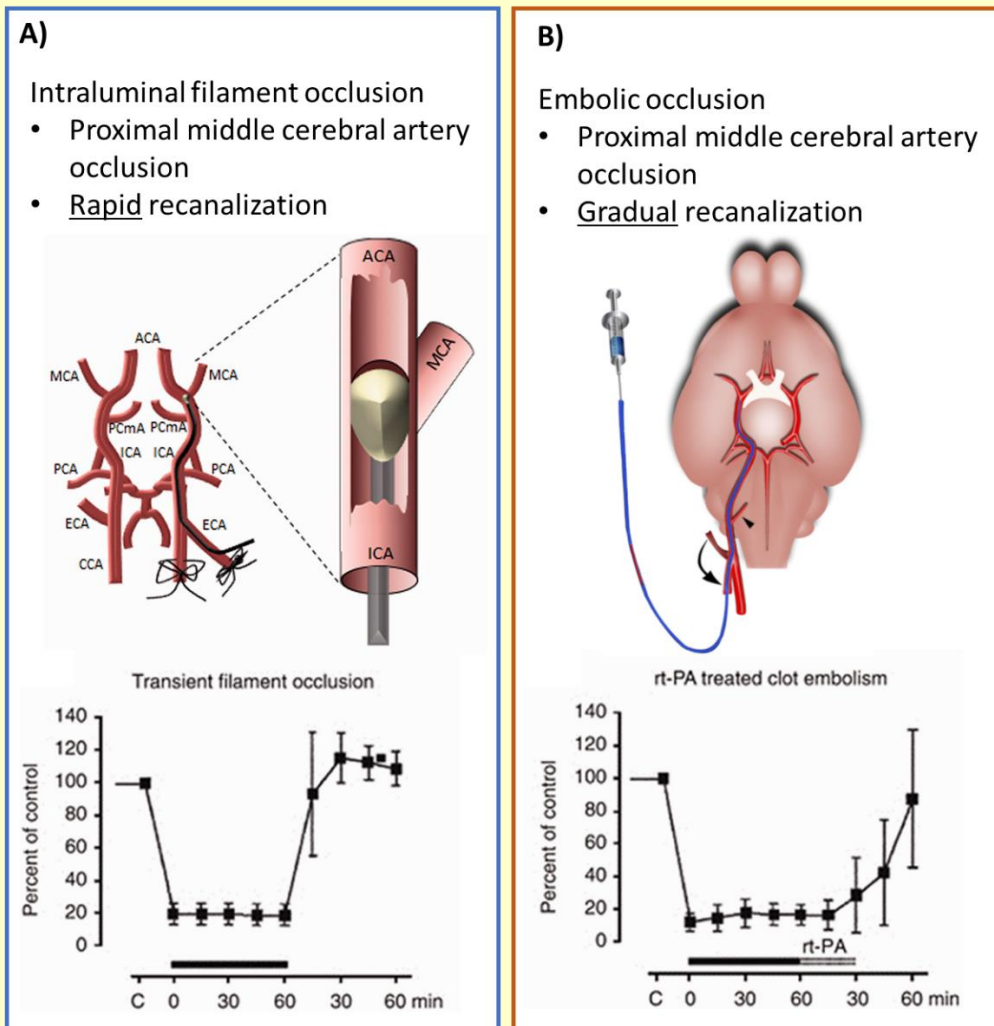


Figure 2. Illustrations of two rat models of focal ischemia: A) transient intraluminal filament occlusion model, B) embolic model. Both models are unique in their ability to capture revascularization treatment and reperfusion efficiency as seen in the accompanying plots (y-axis indicates perfusion value difference from a baseline value). MCA = middle cerebral artery

Both models are meant to induce an occlusion of the middle cerebral artery, but the severity of occlusion and size of the lesion will vary due to e.g., intra-subject differences in vascular anatomy (collaterals). Whether an animal develops a large or moderate lesion is a chance event. Based on our experience in CONTRAST 1.0, we expect that roughly 20% of the animals subjected to this procedure will produce severe discomfort, the remaining 80% will experience moderate discomfort.

It may occur that occlusion is incomplete because of poor filament positioning. With a commonly applied technique called laser Doppler flowmetry, it is possible to confirm, on the operating table, whether our surgery has led to a sufficient reduction in

in appropriate volumes (Diehl et al., 2001). Timing and dosage are optimized based on efficacy in rats (based on literature) or titrated in pilot experiments (pilots 1b/c).

Another intervention of interest is administration of a particular therapeutic gas mix, for example to induce hyperoxia, which is achieved by administering higher levels of oxygen than normally present in the atmosphere, which has recently shown promise in a clinical trial (Li et al., 2022). We will also consider other strategies as they may surface over the course of this project (in consultation with the AwB), but an important criterion is that they must have high translational potential.

Taken together, we are going to make an informed decision based on the results from RQ2-6. Important criteria are that the intervention is already used in the clinic, shows high potential for translation (such as the administration of oxygen), and is safe for administration to rats.

F & G: (early) sacrifice for post-mortem brain assays (specific groups for RQ6)

Animals will be killed by a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU. Brains and other tissue of interest will be collected for additional *ex vivo* analyses. Dedicated “post-mortem” groups can be sacrificed for tissue analyses, this may happen at any moment, but typically we terminate the experiment after the first, second or third MRI session (not the final one). This allows *in vivo* MRI findings from before stroke, before recanalization, and early after recanalization to be correlated to *ex vivo* tissue outcomes. These analyses may include immunohistochemical analysis of hypoxia, infarction, inflammation, molecular markers associated with specific microvascular processes and others; biochemical analyses such as oxygenation, oxidative stress; gene expression analysis. Importantly, animals in post-mortem groups will go through every step listed in Table 1 up until sacrifice.

General experimental workflow

First, we will acquire baseline measurements on primary behavioral outcome parameters (*Table 1, B: baseline behavior*), followed by an MRI session occurring before stroke surgery (*Table 1, C: baseline MRI*).

Our trained technician(s) (pilot 1b/c) will perform a stroke surgery (*Table 1, C1 or C2: stroke induction*). Directly following stroke induction, we perform multiparametric MRI while the vessel is still occluded to determine the initial ischemic lesion (diffusion MRI), the degree of occlusion (magnetic resonance angiography) and [REDACTED] (MRI) (*Table 1, C: MRI before recanalization*).

After **C(1)** or **C(2)**, we may administer the therapeutic intervention (see **E**: “*Therapeutic intervention*” below).

After **C** and predefined waiting time (30 – 180 minutes) the occlusion will be lifted, which will lead to various degrees of recanalization depending on the stroke model. Withdrawal of the filament and closure of the wound (**D1-r**) will be done outside the MRI scanner. Administration of the thrombolytic can be done in- or outside the scanner (**D2-r**).

After **D1-r** or **D2-r**, we may also administer the therapeutic intervention (see “*Therapeutic intervention*” below). We may also sacrifice a post-mortem group before recanalization, and/or at a certain time after recanalization (**F**) to validate/compare the effects of recanalization treatment on brain tissue using *ex vivo* assays.

Following thrombolytic administration and/or filament withdrawal we will apply an expanded array of multiparametric MRI experiments (*Table 3, C MRI post-recanalization*). This allows us to study the effect of recanalization on lesion evolution, [REDACTED] and markers of brain function. The first post-recanalization MRI will be performed up to 3 hours after onset of reperfusion without discontinuation of anesthesia. Including stroke induction, pre-recanalization MRI and recanalization this adds up to a maximum of 5 hours of anesthesia at maximum, after which animals will wake up from anesthesia (this is the same as in CONTRAST 1).

Within two weeks after stroke we will conduct a behavioral test battery and an MRI session (*Table 3, B & C: post-recanalization behavior & MRI*), which we may repeat up to 3 times per week (6 times in total).

After the final measurement, the rats will be killed and brain tissue excised for post-mortem analysis via brain assays (*Table 3, G: sacrifice*).

Pilot 1a:

In a small subset of healthy animals, we will develop and test a novel multiparametric MRI protocol that allows the measurement of our primary and secondary outcome parameters. Animals used for this pilot may be used 5 times at maximum, with a minimum interval of 7 days in between two MRI sessions. For MRI protocol development, sacrifice is not the experimental endpoint and scanning only induced mild-to-moderate stress. Animals that have been used for this pilot will therefore be reused in non-recovery experiments for pilot 1b or 1c, which contributes to reduction.

Pilot 1b:

This pilot is required to set up an inducible hypertension model in naïve wild-type animals. As mentioned above, models of secondary hypertension may require surgery, such as the renovascular clipping model. This pilot is meant to train personnel and to verify hypertension phenotypes, which should become apparent by measuring blood pressure after a certain amount of time (typically a few weeks).

The training of models will be the same as for CONTRAST 1: we study videos/papers about the surgery, converse with experts if necessary. Initial practice will happen on cadavers. Once the procedure can be successfully completed in a cadaver, we will train on live animals in non-recovery conditions. Once the procedure can be completed in the maximum allotted time (45 minutes, to be discussed with experts) we will proceed with hypertension induction experiments where the animal will be woken up from anesthesia.

The presence of hypertension will be validated by measuring systolic blood pressure using a 1) Millar pressure transducer through the femoral artery, 2) telemetry with a sensor implanted in the carotid, or 3) tail cuffs. Of these methods, the former is more traditional, but the latter is noninvasive, and therefore is preferred. We will only verify hypertension with more invasive methods if the cuff device is inaccurate. The non-invasive tail-cuff method can be performed awake, which requires some training/habituation that can induce mild stress. However, we can also acquire data while the animal is anesthetized in the MRI scanner, which has our preference.

An important part of this pilot will be the treatment of anti-hypertensive drugs to lower blood pressure. After induction of hypertension, we will verify the efficacy of the treatment using the abovementioned validation technique.

Pilot 1c:

Pilot 1c will be dedicated to training and optimization of the different animal models of stroke and comorbidity by one technician and one researcher that will also perform surgeries for these studies (and all subsequent studies).

The training of models will be the same as for CONTRAST 1: we study videos/papers about the surgery, converse with experts if necessary. First practice will happen on cadavers. Once the procedure can be fully covered in a cadaver, we will train on live animals in non-recovery conditions. Once the procedure can be completed in 45 minutes (same as in CONTRAST 1) and occlusion is verified with MRI, we will proceed with stroke induction experiments where the animal will be woken up from anesthesia.

We wish to reiterate that our group is well-acquainted with the intraluminal and thrombo-embolic stroke model. Rats reserved for these stroke model will only be used if new personnel has to be trained, which is not the case at time of writing. Other rats reserved for pilot 1b are used for introduction and training of induced hypertension models.

Following surgery we will perform one single MRI session between 0 hours to 7 days post stroke, after which the animal will be euthanized. Experts in the field will analyze the MRI data and determine whether surgery was successful in terms of lesion size and location. Data gathered during our pilot study will inform us on the most optimal occlusion-to-recanalization intervals. If we are unable to successfully induce hypertension after this pilot, we will not include this model in future studies. Animals in this pilot will also be used to optimize the behavioral test battery and to train repeated blood sampling of choice, with a maximum number of blood samples of 5 within 7 days.

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

We performed a-priori power analyses with G*Power (v3.1.9.7), evaluated by the AWB and statistician.

Based on our experience, animal models of stroke described here have an attrition rate of $\leq 20\%$ for the filament model (Study 1 & 2), $\leq 23\%$ for the embolic stroke model (Study 3 & 4). This is not only due to risk of complications but also insufficient lesion size, meaning that the occlusive device is not always successful in creating ischemia. This sometimes forces us to exclude the animal. Moreover, we expect to lose $\leq 5\%$ of our animals due to repetitive MRI during/after stroke. This is all accounted for in our estimations. These considerations notwithstanding, in CONTRAST 1.0 (AVD1150020184985) we noted that our attrition rates tended to decrease substantially as researchers and technicians became more skilled with the model and experimental workflow.

PILOTS:

Pilot 1a: For development and testing of new MRI protocols we need **50 rats at maximum**. Because MRI protocol development and testing can be done repetitively and non-destructively, we can reuse these animals for pilots 1b and 1c, so they will not count towards the grand total of animals requested for this appendix.

Pilot 1b: For training of two people (technicians and/or researchers) *and* for the optimization of the inducible hypertension model we need **100 rats at maximum**.

Pilot 1c: For the **possible** training of a maximum of two people (research technician and/or researchers) on stroke models we need **100 rats at maximum**. This number is based on our experience for CONTRAST 1. We emphasize we currently have an experienced research technician so we will probably not use these animals.

The maximum number of animals necessary for the pilot experiments (1a: MRI protocol development, 1b: hypertension model introduction, 1c: stroke model training) is based on our previous experience.

MAIN STUDIES

The estimated number of animals for the main study will be based on ANCOVA analyses, with dependent variable: lesion size regressed against four factors: comorbidity, predisposition (i.e., occlusion duration (3 levels) OR embolus type (3 levels)), sex and intervention. Four covariates will be included: XXXXXXXXXX brain health MRI marker, baseline lesion size and age. Power calculations were made for a medium effect size (f) of 0.25, a significance level (α) of 0.05 and a power ($1 - \beta$) of 0.8.

Samples sizes for study 1-4 are based on this Gpower calculation and shown below (*Table 2*).

Each study has 3 common factors with multiple levels: comorbidity (2 levels: y/n), stroke feature (3 levels of occlusion times OR embolus types), sex (2 levels, M/F) and finally intervention (2 levels: y/n), so $2 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 2 = 24$ factor levels (k). The numerator df is $(2-1) \cdot (3-1) \cdot (2-1) \cdot (2-1) = 2$.

POST-MORTEM GROUPS

For each post-mortem group we need a total of 4 animals based on our own experience (attrition not included). Post-mortem group sizes are based on previous literature (Llombart et al., 2017) and our experience. It is not feasible to incorporate post-mortem groups for every condition and every time point of interest, therefore, based on our previous experience, we ask for a **maximum of 80 animals for post-mortem studies**, including a fixed attrition rate of 20%. With these numbers, we can investigate 16 post-mortem groups. The scientific goal of each post-mortem group may vary. Our priority is to identify sequelae of stroke that can inform us on futile recanalization at tissue-level, but we also may use them to disentangle sex effects for example.

Table 2: allocation of experimental animals

	n	+ attrition rate	Corrected N
Study 1	158	+ 20%	198
Study 2	158	+ 20%	198
Study 3	158	+ 23%	205
Study 4	158	+ 23%	205
Post-mortem groups	64	+ 20 %	80
Total	696	190	886

Combining animals for the pilot studies (200), main studies (806), and post-mortem groups (80), we arrive at a maximum of 200+806+80=1086 rats.

Of these rats, 222 will be genetically altered to study primary hypertension. This number is comprised of half the animals for Study 1 (99) and half the animals for Study 3 (~103), and correspondingly, 20% of the total number post-mortem animals (20).

We emphasize that 1086 is the **maximum** amount we will ask for this appendix. The attrition rates are based on literature and our experience, but CONTRAST 1.0 taught us it may turn out lower depending on the skill of researchers and technical personnel involved (which may be affected by turnover).

B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rat	Licensed breeder or surplus acquired in-house	2-24 months (no preference)	200	Male & Female	Possibly	Any
2	Rat	Licensed breeder or in-house breeding program	2-18 months	222	Male & Female	No	Genetic hypertensive model (Spontaneous Hypertensive Wistar or Dahl salt-sensitive)
3	Rat	Licensed breeder	2-18 months	664	Male & Female	Yes	Depends on genetic background of strain used for serial nr 2 (likely Wistar)

Provide justifications for these choices

Species	Rats are the best choice for the stroke models described herein, especially for the thrombo-embolic model which is not available in mice. Rats are also better amenable for the proposed experimental MRI techniques. More generally speaking, lab rats are a good choice for stroke modeling as they are mammalian and share features with human brains (vascular anatomy (Circle of Willis), neuronal cell
---------	--

	types and connectivity patterns), yet they are small, cost-effective, with relatively short lifespans which allows for high throughput studies.
Origin	Wild-type animals will be acquired from a preferred commercial licensed breeder or own breeding facility.
Life stages	<p>Initially, young-adult rats will be used (~3 months) for stroke modeling, especially during the pilot phase. Hypertension induction must occur at least one month prior to ensure blood pressure has increased before stroke induction. Therefore, the earliest life stage at which experiments will start is 2 months. To address the contribution of aging to stroke outcome, we will use rats of up to 18 months.</p> <p>We will not use rats older than the age of 18 months, because SHRs are known to develop progressive kidney damage as hypertension persists throughout the lifecycle. We expect the same damage occurs to DSS rats. Hypertensive kidney damage is not morphologically evident before 30 weeks of age, the damage then progresses with increasing age, but does not generally cause renal failure (Hultström, 2012). The gradual buildup of kidney damage may cause kidney failure, which incurs unacceptable discomfort. We will stay alert to the signs of kidney damage and we will not use animals older than 18 months in our studies to minimize this risk.</p>
Number	<p>The project includes experiments on the two hypertension subtypes (A1) and two stroke and treatment characteristics (D), repeated selection from RQ 2 to RQ 9 and multiple experimental sets for RQ6. The total estimated number of animals heavily depends on the outcome of experiments prior to each selection, the number of experimental series needed to unravel mechanisms (RQ6) and the number of molecular targets selected.</p> <p>To complete longitudinal study in each of the four models we ask 806 rats at maximum (attrition included), and an additional 80 rats at maximum to unravel the molecular mechanisms futile recanalization at tissue-level at various stages post-stroke (“post-mortem groups”). For pilots leading up to these studies, we expect we need 200 rats at maximum. After accounting for expected attrition rates (Table 2), this brings us at a total 1086 rats at maximum.</p>
Gender	There are well-described sex differences that relevant to stroke outcome, it stands to reason that this independent variable will interact with other variables to affect study outcomes. Beyond the pilot phase, all experiments will therefore combine male and female animals. These experiments are not designed nor powered to detect small sex differences, but we will monitor these differences as our studies progress. Where relevant and where possible, we will consider separate experiments testing specific hypotheses on sex differences.
Genetic alterations	To investigate primary hypertension, a genetic hypertension model will be used.
Strain	<p>To model primary hypertension, we will use genetically manipulated rat strains: Spontaneous Hypertensive Wistar-Kyoto (SHR) or Dahl/Salt sensitive (DSS) rats.</p> <p>Strains will be used that are suitable for stroke research and share a similar genetic background to the primary hypertension model. For example, the spontaneous hypertensive Wistar, a candidate model for hypertension, will be compared to wild-type Wistar rats. Another likely candidate is Sprague-Dawley rat, and their genetically hypertensive Dahl salt-sensitive counterparts.</p>

C. Accommodation and care

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

Yes

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

We strive to provide housing and care are in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU. However, sometimes animals might need to be housed solitarily temporarily in their home cage (max. 72h) to ensure the best recovery as possible after a surgical procedure. After 72h, animals are socially housed. Adverse effects are not expected.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Click or tap here to enter text.

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

Surgery: All surgical procedures resulting in pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia.

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

1. Altered movement, paralysis, circling behaviour (function will partly recover within one week)
2. Bleeding
3. Insufficient recovery after surgery (numbness)
4. Wound infection (redness, temperature)
5. Weight loss
6. Effects of therapeutic intervention

Explain why these effects may emerge.

(Lettering refers to the animal procedures listed above)

1. The large vessel occlusion will temporarily restrict blood flow to a certain part of one hemisphere. This will result in an infarct and the animal will experience a functional deficit. In turn, animals are hampered in natural behavior (**D1 & D2**)
2. In rare occurrences, subcutaneous bleeding might be observed as the described models require arteriotomy (**D1 & D2**)
3. Insufficient recovery (numbness) after surgery may develop as a complication (**A1 & D**)
4. Wound infection may emerge after surgery (**A1 & D**)
5. Side-effects from therapeutic intervention may occur depending on administration route, but these are not expected (**E**)
6. Depending on the administration route, notably intravenous administration. Adverse effects of hyperoxic gas mix are not expected (**E**).

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

1. Rats can compensate these functional losses rather quickly compared to humans, and therefore function will largely recover within the first week of survival. Rats will be euthanized if stroke severity leads to humane endpoints (next section)
2. During surgery and prior to skin closure, the location is observed, and any bleeding is treated by applying pressure, until bleeding stops (normally a few minutes), only then the skin is closed. Bleeding beyond this time point is not expected.
3. Recovery after surgery is optimized by maintaining body temperature during and immediately after surgery (feedback-controlled heated pad, careful disinfecting of the incision area, protection against dryness of the eyes by artificial tears, application of saline to prevent dehydration). Part of the animal cage will be placed on a heating mat to aid recovery after surgery.

4. Wound infection is prevented by proper application of surgical SOPs. Wounds are monitored daily. Use of antibiotics will be considered if deemed appropriate.
5. Liquid food and/or food pellets will be placed inside the cage. Furthermore, in case of exacerbated weight loss, Ringer Lactate or NaCl will be subcutaneously administered if the nutritional status of the animal is deemed insufficient.
6. If possible, the therapy will be delivered non-invasively.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

We will apply the same HEP strategy as in CONTRAST 1. Inducing stroke requires vigilance for possible HEPs. The same HEP strategy applies to all animals, i.e., that either are normotensive and hypertensive (hypertension is not expected to lead to severe discomfort that requires a HEP).

Our HEP strategy combines information from two sources: body weight and motility.

We will use an animal motility score to identify the humane endpoint for animals suffering from stroke.

The following motility scores will be assessed in their home cage:

- (0) Normal exploratory behavior
- (1) Slightly reduced exploratory behavior
- (2) Moving limbs without proceeding
- (3) Moving only to stimuli
- (4) Unresponsive to stimuli, with normal muscle tone
- (5) Severely decreased tone, premortal signs.

Animals can lose up to 20% of their weight due to ischemic stroke. Normally, the decline in body weight should decrease and stabilize, and animals should start gaining weight again after three days. If this is not the case, or animals lose more than 20%, we will contact the AwB to discuss whether we should keep the animal or euthanize it (body weight on its own is too crude as an indicator for a HEP). When the animal displays normal behaviour (e.g. feeding, exploring, resistance to fixation by researcher) we can decide to monitor for another day. When behaviour is abnormal (little to no movement, no feeding behaviour, easy to fixate by hand) we will decide with the AwB whether we should apply a HEP.

Indicate the likely incidence.

As a general rule of thumb, this is a rare occurrence in fewer than 5% of the entire study population. During CONTRAST 1.0, the project that preceded this one, these events were extremely rare (<0.01%).

F. Classification of severity of procedures

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

Procedure codes:

1. Large vessel occlusion (D1 & D2), combined with or without treatment. The prospect of serious stroke symptoms, combined with the surgery and repetitive imaging behavioral testing and blood pressure measurements. This procedure leads to severe lesions in animals born with poor collaterals, but mild-to-moderate lesions in animals with good collaterals. Applicable to pilot 1c (where we assume 50% or experiments to be non-recovery) and main studies.

2. Induced hypertension (A1) e.g., by subcutaneous osmotic minipump or renal clipping, and repetitive MRI imaging thereafter (C). Also applicable to pilots 1a and 1b due to repetitive anesthesia for development of MRI protocols. Animals used for pilot 1a can be used in pilots 1b or 1c, but only in a non-recovery condition.
3. Training for large vessel occlusion and induced hypertension. Initial training will occur in non-recovery settings.

Procedures	Species	Sex	n	Maximum discomfort (cumulative)	Source of discomfort
1	Rat	Both	177 (10 (pilot 1c) and 168 (main studies))	Severe	<u>Procedure 1 (n=177)</u> Cumulative moderate discomfort in each step (A through C). Stroke lesions (D) turn out large due to poor collaterals, and leads to severe discomfort in combination with repetitive imaging (C), test batteries and blood pressure measurements (B) and intervention (E). Sacrifice in F and G is a non-recovery procedure.
1 & 2	Rat	Both	809 (pilot 1a&1b = 50, pilot 1a&1c = 40, main studies = 719)	Moderate	<u>Procedure 1 (n=709):</u> Cumulative moderate discomfort in each step (A through C). Stroke lesions (D) turn out mild-to-moderate due to good collaterals, and leads to moderate discomfort in combination with repetitive imaging (C), test batteries and blood pressure measurements (B) and intervention (E). <u>Procedure 2 (n=100)</u> Moderate discomfort in A1 and C. MRI requires general anesthesia and recovery. Sacrifice in F and G is a non-recovery procedure. Animals used in pilot 1a and re-used in pilot 1b/1c will be used in non-recovery procedures.
3		Both	100 (pilot 1b: 50; pilot 1c: 50)	Non-recovery	<u>Procedure 3 (n=100)</u> Non-recovery discomfort (handling and anesthesia induction).
Total			1086	Severe: 16% Moderate: 75% Non-recovery: 9%	

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	To fully understand and study recovery from stroke, we need to study it in a living brain. Good <i>in vitro</i> or <i>in silico</i> models of the brain and its vasculature that recapitulate the complex interactions between all elements of the neuropil do not exist. Ethical considerations do not allow repetitive MRI in the
-------------	---

	hyperacute phase of stroke. Rodents offer a good alternative for non-human primates in studying neuronal function and cognition, with higher throughput. They are mammalian and share similar basic structures (vascular anatomy, neuronal subtypes and connectivity) as human brains.
Reduction	<p>Our technicians will be trained by experts in the field, and instruction videos demonstrating the surgeries will be studied prior to training. One of the technicians already has years of experience with microsurgeries. We plan to perform multiple surgeries per day, allowing us to quickly surmount the learning curve. Experiments will be executed in succession with carefully designed go/no go and selection criteria. Altogether, this is expected to minimize the total number of animals required.</p> <p>In this project, MRI is the main imaging method of choice. Non-destructive imaging allows studying the effects of stroke in a mixed (within- and between-subject) design, which reduces the number of rats necessary to reach our goal since each animal can be measured multiple times. Our laboratory has a long history of neuro- MRI in rodents, it is expected that our experience keeps bumping into procedural pitfalls to a minimum, which in turn contributes to a reduction in the number of animals necessary for this project.</p>
Refinement	<p>The procedures described in this project are based on a large body of scientific and experimental knowhow and experience and are performed by highly trained personnel.</p> <p>All imaging experiments and surgeries will be performed under anesthesia. During these procedures, animal physiology (temperature, heart rate, respiration rate, oxygenation and temperature) will be continuously monitored and kept within physiological range. This will minimize stress/discomfort during and after surgical procedures (according to IMPROVE guidelines (Percie du Sert et al., 2017)).</p>

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

No

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

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Re-use

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

No > Continue with question I.

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

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

No

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

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Repetition

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

Not applicable.

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

Click or tap here to enter text.

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Click or tap here to enter text.

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

Euthanasia of animals after the final serial MRI is necessary to collect brains for post-mortem tissue analysis (immunohistochemistry, transmission electron microscopy or mass spectrometry).

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.

Click or tap here to enter text.

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

No > Describe the method of killing.

Click or tap here to enter text.

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

Animals will be killed either by an overdose of isoflurane (followed by transcardial perfusion-fixation). Perfusion-fixation is required for immunohistochemistry or electron microscopy. Both methods of killing are acceptable according to Annex IV of Directive 2010/63/EU since the animal will be killed while deeply anesthetized.

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

Click or tap here to enter text.

References

Ahnstedt H, McCullough LD, Cipolla MJ (2016) The Importance of Considering Sex Differences in Translational Stroke Research. *Translational Stroke Research*. 7:261–273. DOI: 10.1007/s12975-016-0450-1.

Banerjee C, Chimowitz MI (2017) Stroke Caused by Atherosclerosis of the Major Intracranial Arteries. *Circulation Research*. 120:502–513. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308441.

Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2:396–409. DOI: 10.1602/neurorx.2.3.396.

Cipolla MJ, Liebeskind DS, Chan S-L (2018) The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 38:2129–2149. DOI: 10.1177/0271678X18800589.

De Feyter HM, Behar KL, Corbin ZA, Fulbright RK, Brown PB, McIntyre S, Nixon TW, Rothman DL, et al. (2018) Deuterium metabolic imaging (DMI) for MRI-based 3D mapping of metabolism in vivo. *Science Advances*. 4:eaat7314. DOI: 10.1126/sciadv.aat7314.

- De Meyer SF, Andersson T, Baxter B, Bendszus M, Brouwer P, Brinjikji W, Campbell BC, Costalat V, et al. (2017) Analyses of thrombi in acute ischemic stroke: A consensus statement on current knowledge and future directions. *International Journal of Stroke*. 12:606–614. DOI: 10.1177/1747493017709671.
- Deng G, Xiao J, Yu H, Chen M, Shang K, Qin C, Tian D-S (2022) Predictors of futile recanalization after endovascular treatment in acute ischemic stroke: a meta-analysis. *Journal of NeuroInterventional Surgery*. 14:881–885. DOI: 10.1136/neurintsurg-2021-017963.
- Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Van De Vorstenbosch C (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*. 21:15–23. DOI: 10.1002/jat.727.
- Dijkhuizen RM, Knollema S, van der Worp HB, Ter Horst GJ, De Wildt DJ, Berkelbach van der Sprenkel JW, Tulleken KA, Nicolay K (1998) Dynamics of cerebral tissue injury and perfusion after temporary hypoxia-ischemia in the rat: evidence for region-specific sensitivity and delayed damage. *Stroke*. 29:695–704. DOI: 10.1161/01.str.29.3.695.
- Franx BAA, Tiebosch IA, Toorn A van der, Dijkhuizen RM (2024a) Chronic hypertension and perfusion deficits conjointly affect disease outcome after tPA treatment in a rodent model of thromboembolic stroke. :2024.03.20.585876. DOI: 10.1101/2024.03.20.585876.
- Franx BAA, van Tilborg GAF, Taha A, Bobi J, van der Toorn A, Van Heijningen CL, van Beusekom HM, Wu O, et al. (2024b) Hyperperfusion profiles after recanalization differentially associate with outcomes in a rat ischemic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 44:209–223. DOI: 10.1177/0271678X231208993.
- Franx BAA, van Tilborg GAF, van der Toorn A, van Heijningen CL, Dippel DWJ, van der Schaaf IC, Dijkhuizen RM, on behalf of the CONTRAST consortium (2024c) Propofol anesthesia improves stroke outcomes over isoflurane anesthesia—a longitudinal multiparametric MRI study in a rodent model of transient middle cerebral artery occlusion. *Frontiers in Neurology*. 15 DOI: 10.3389/fneur.2024.1332791.
- Hoffmann U, Sheng H, Ayata C, Warner DS (2016) Anesthesia in Experimental Stroke Research. *Translational Stroke Research*. 7:358–367. DOI: 10.1007/s12975-016-0491-5.
- Hultström M (2012) Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 30:1087. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328352b89a.
- Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, et al. (2019) Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 73:e87–e120. DOI: 10.1161/HYP.000000000000090.
- Li W, Qi Z, Ma Q, Ding J, Wu C, Song H, Yang Q, Duan J, et al. (2022) Normobaric Hyperoxia Combined With Endovascular Treatment for Patients With Acute Ischemic Stroke. *Neurology*. 99:e824–e834. DOI: 10.1212/WNL.0000000000200775.
- Llombart V, Trejo SA, Bronsoms S, Morancho A, Feifei M, Faura J, García-Berrocoso T, Simats A, et al. (2017) Profiling and identification of new proteins involved in brain ischemia using MALDI-imaging-mass-spectrometry. *Journal of Proteomics*. 152:243–253. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.11.014.
- Miksche LW, Miksche U, Gross F (1970) Effect of sodium restriction on renal hypertension and on renin activity in the rat. *Circ Res*. 27:973–984. DOI: 10.1161/01.res.27.6.973.
- Percie du Sert N, Alfieri A, Allan SM, Carswell HV, Deuchar GA, Farr TD, Flecknell P, Gallagher L, et al. (2017) The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments). *J Cereb Blood Flow Metab*. 37:3488–3517. DOI: 10.1177/0271678X17709185.

- Seners P, Turc G, Lion S, Cottier J-P, Cho T-H, Arquizan C, Bracard S, Ozsancak C, et al. (2020) Relationships between brain perfusion and early recanalization after intravenous thrombolysis for acute stroke with large vessel occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 40:667–677. DOI: 10.1177/0271678X19836288.
- Straathof M, Meerwaldt AE, De Feyter HM, de Graaf RA, Dijkhuizen RM (2021) Deuterium Metabolic Imaging of the Healthy and Diseased Brain. *Neuroscience.* 474:94–99. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.01.023.
- Sutherland BA, Neuhaus AA, Couch Y, Balami JS, Deluca GC, Hadley G, Harris SL, Grey AN, et al. (2016) The transient intraluminal filament middle cerebral artery occlusion model as a model of endovascular thrombectomy in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36:363–369. DOI: 10.1177/0271678X15606722.
- van der Knaap N, Franx BAA, Majoie CBLM, van der Lugt A, Dijkhuizen RM, on behalf of the CONTRAST consortium (2024) Implications of Post-recanalization Perfusion Deficit After Acute Ischemic Stroke: a Scoping Review of Clinical and Preclinical Imaging Studies. *Transl Stroke Res.* 15:179–194. DOI: 10.1007/s12975-022-01120-6.
- van der Wijk A-E, Lachkar N, de Vos J, Grootemaat AE, van der Wel NN, Hordijk PL, Bakker ENTP, vanBavel E (2019) Extravasation of Microspheres in a Rat Model of Silent Brain Infarcts. *Stroke.* 50:1590–1594. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.024975.
- Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20:84–91. DOI: 10.1161/01.STR.20.1.84.
- Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q, Ewing JR (1997) A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Research.* 766:83–92. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)00580-5.



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure	Serial number	Type of animal procedure
	<i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	2	Testing the efficacy of [redacted] and [redacted] for neuroprotection in an animal model stroke

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.

An overview of the experimental approach, including its primary and secondary outcome parameters, is shown in Figure 1.

About half of the patients with acute ischemic stroke (AIS) that are successfully recanalized remains dependent on the help of others or dies in the first 90 days. This indicates the need for additional effective treatments to promote functional recovery. Neuroprotective treatments are interventions targeting preservation of neuronal structure or functioning other than reperfusion strategies and hold potential to modulate infarct growth and improve functional recovery.

An important goal of CONTRAST-2 is to assess the effects of two candidate neuroprotective agents, [redacted] and [redacted] to improve early recovery and long-term functional outcome in patients with acute ischemic stroke treated with endovascular thrombectomy. Previous work has shown that these compounds may improve outcomes through beneficial effects exerted on cerebrovascular functioning, which is a major target of the current research program. As discussed in the main proposal, both compounds have been tested safe for rats. [redacted] has been effective in various models of vascular disease [redacted] and [redacted] has shown similar promising results in *in vitro* models of hypoxia [redacted]. Our consortium partners are launching early-phase clinical trials that assess the efficacy of these compounds in combination with recanalization therapy. In parallel, we will test if these agents improve post-stroke tissue and functional

outcome in a rat tMCAO model and assess their mode of action on cerebrovascular- and brain function by evaluating treatment effects on (peri)lesional tissue.

We will establish the most optimal timing and dosage of these compounds in our rodent models of stroke in a pilot before commencing this preclinical trial (**go/no-go**).

For study 2, the primary outcome will be lesion growth. We will relate the primary outcome parameter to behavioral outcome, cerebral hemodynamics, and MRI-based markers of tissue health. Results from these analyses will be correlated to information from brain assays (*Figure 1, post-mortem tissue analyses*); these experiments will be carried out by consortium partners.

The primary aim of this study is to assess the effects of [REDACTED] and [REDACTED] on the lesion evolution up to three months after ischemia-reperfusion (main proposal research question 7).

The secondary aim of this study is to assess the effects of [REDACTED] and [REDACTED] on the severity of the neurological deficit up to three months, and to identify the contribution of [REDACTED] and biomarkers of tissue health in this process (main proposal research question 7).

Experimental design and timeline

Experimental methods

Similar to appendix 1, *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) will be the mainstay of these studies, which allows us to repetitively study the abovementioned independent and dependent variables. Behavioral testing will be included to study the effect of stroke on functional outcome. We also sample blood (max 5 times) in appropriate volumes to investigate relevant biomarkers. We will sample blood during times when the animal is anesthetized to minimize discomfort.

Our *in vivo* findings may be correlated to data from *ex vivo* analyses to uncover cellular/molecular mechanisms of treatment effects, performed on tissue that will be harvested from animals at the end of the study, and from dedicated “post-mortem” groups at predetermined time points that have been synchronized to the MRI experiments. The *ex vivo* experiments will be carried out by our consortium partners.

We will employ the intraluminal filament model of stroke models which recapitulates the recanalization efficiency of endovascular thrombectomy (Sutherland et al., 2016). One occlusion duration between 30 – 180 minutes will be chosen based on desired severity of the stroke lesion (Carmichael, 2005). The retraction of the filament may be combined with administration of a thrombolytic to investigate the interactions as an adjunct treatment. This is similar to how reperfusion therapy is executed in the clinic, where thrombolytics can be administered before/during mechanical thrombectomy (Oliveira-Filho and Samuels, n.d.)

Cofactors

We will include both male and female animals to incorporate sex effects in this study.

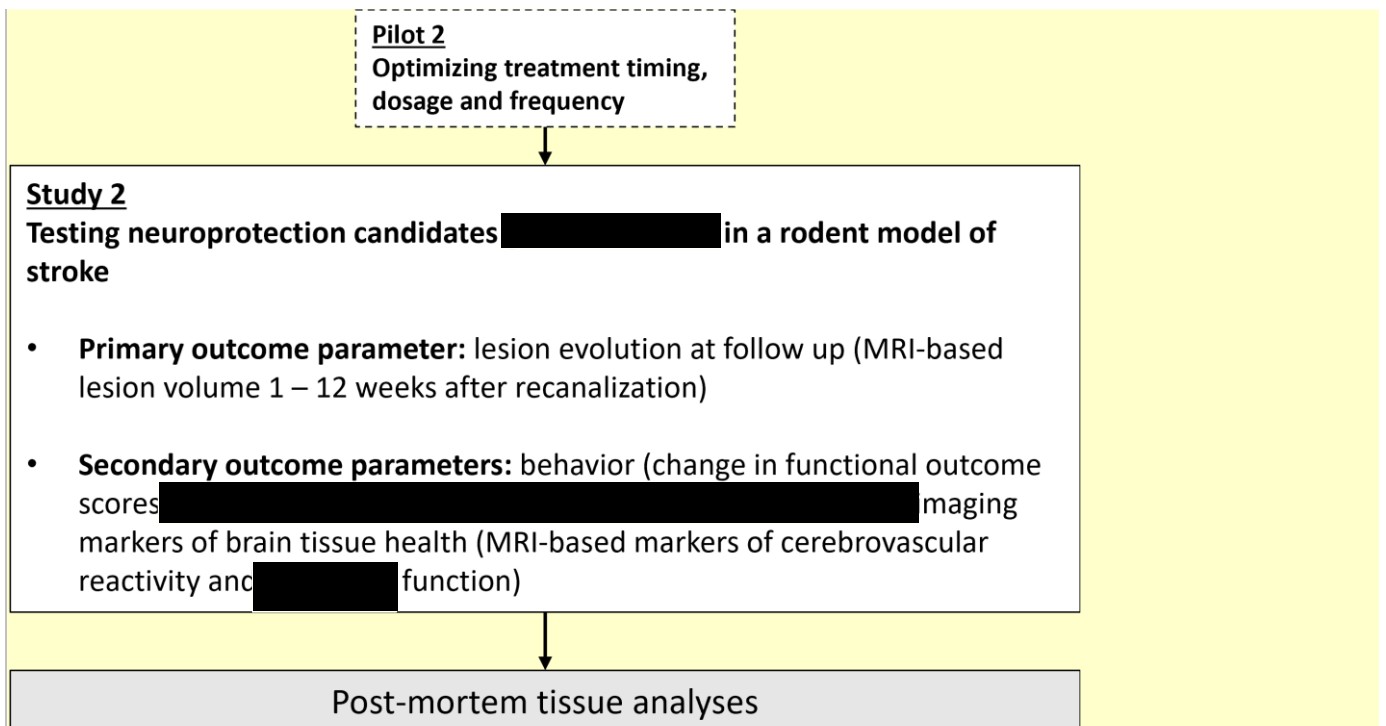


Figure 1: Overview of study 2 outcome measures. MRI = magnetic resonance imaging

General timeline

This is a basic three-arm preclinical trial design. Each rat will undergo middle cerebral artery occlusion and will go through at least several of these steps.

Time (days)	Code	Details
[-37 ... -7]	A	Arrival at facility & habituation
-3	B	Baseline behavior
	C	Possible baseline MRI (one session, 2.5h maximum, general anesthesia and contrast agent injection) and blood sampling
0	F(1)	Possible sacrifice of post-mortem group
0	D	Stroke: induction (intraluminal filament occlusion)
0	C	MRI during occlusion, (one session, 2.5h maximum, continued general anesthesia and contrast agent injection)
0	F(1)	Possible sacrifice of post-mortem group
0	E	Intervention E1: ██████████ E2: ██████████ E3: placebo
0	D-r	Stroke: recanalization (intraluminal filament retraction and possibly thrombolytic administration)
[0 ... 5]	E	Intervention E1: ██████████ E2: ██████████ E3: placebo
[0 ... 84]	B	<u>Behavioral testing</u> (min 1, max 4 test batteries, max 3 session/week)
[1 ... 84]	C	Post-recanalization <u>MRI sessions</u> after recanalization (min 1, max 8 sessions, max 2.5h/d, max 2 sessions/week; MRI includes general anesthesia and contrast agent injection). MRI scanning may be preceded by blood sampling (max 4 times).
[1 ... 84]	F(2)	Possible sacrifice of post-mortem group (before study endpoint)
[7 ... 84]	G	Sacrifice (final endpoint)

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

B: Behavioral testing (max 4x test batteries per animal)

Behavioral testing is relevant to the validation of ischemic injury and treatment effects. There is a wide variety of reliable behavioral tests available that can assess behavioral and functional deficits after stroke. We will consider several behavioral tests from this set that together form a battery to assess sensorimotor deficit (e.g.: sticky dot removal test, forelimb asymmetry, corner test, beam walk, grip strength, Rotarod, unforced locomotion gait test, pellet reaching test, neurological deficiency score) and cognitive (e.g.: Barnes maze, novel object recognition) and psychological impairments (e.g.: open field test). We have experience with all these tests, and the most optimal (combination of these tests) will be selected. They are expected to induce no more than a mild level of stress. Based on our experience from CONTRAST 1.0, the most likely choice is the neurological deficiency score and pellet reaching test, these tests are similar to tests used in clinical settings and have high face- and external validity.

We note that the pellet reaching test, beam walk test, unforced locomotion gate test and Barnes maze require training sessions in order to improve test compliance. If these tests are selected, up to three training sessions (one per day) are included before the baseline experiment. In addition, the pellet reaching test requires a fasting period of 12h at maximum for test compliance. As mentioned, these tests induce no more than a mild level of stress. This is initially caused by handling but subsides over time as the rat habituates to the researcher.

C: MRI sessions

Each MRI session contains a basic set of experiments to generate images of the rat brain, such as diffusion-weighted MRI. Other than that, the animal has to be anesthetized to ensure compliance for MRI (movement disturbs data acquisition). MRI sessions meant to acquire data during occlusion and immediately after recanalization will be conducted without discontinuation of anesthesia. MRI experiments are non-invasive, but there are a few exceptions: some experiments require a minimally invasive procedure during scanning. During these experiments, which are motivated in the main proposal (under "Strategy"), animals can receive:

- an intravenous injection of a contrast agent to enhance the signal of the blood (max 1x per animal per MRI session). We use this to directly measure [REDACTED] and blood-brain barrier permeability.
- a hypercapnic gas challenge, meaning that the anesthesia gas-mixture will be adjusted to 10% CO₂ or 100% O₂, but carbogen may also be used. This is used to evaluate cerebrovascular reactivity, or the ability of the vessels to dilate or constrict (max 1x per animal per MRI session).
- an intravenous injection of deuterated glucose to monitor active glucose [REDACTED] With this technique, we can study anaerobic glycolysis in cells (De Feyter et al., 2018; Straathof et al., 2021).

After stroke surgery, MRI sessions are repeated to track the effects of our manipulations on outcomes in the brain, repetitive MRI sessions require reinduction and maintenance of general anesthesia. Each MRI session will take 2.5 hours at maximum.

MRI sessions may be preceded by blood sampling in appropriate volumes (Diehl et al., 2001), while the animal is anesthetized, to measure levels of relevant biomarkers.

D: Animal model of stroke: *Intraluminal filament model*

This method uses intra-arterial access to occlude a cerebral artery. It involves introducing a silicon-tipped nylon thread into the extracranial internal carotid artery, which is advanced until its tip occludes the middle cerebral artery (MCA; Figure 2) (Zea Longa et al., 1989). If the procedure is successful, occlusion leads to a perfusion deficit (hypoperfusion) in the tissue irrigated by the MCA. After a predetermined amount of time, the filament is retracted to allow recanalization. The occlusion of the middle cerebral artery accounts for approximately half of all ischemic stroke etiologies (Banerjee and Chimowitz, 2017). It has been argued that this model is the best option for mimicking the ischemia-reperfusion dynamic of mechanical thrombectomy (Sutherland et al., 2016).

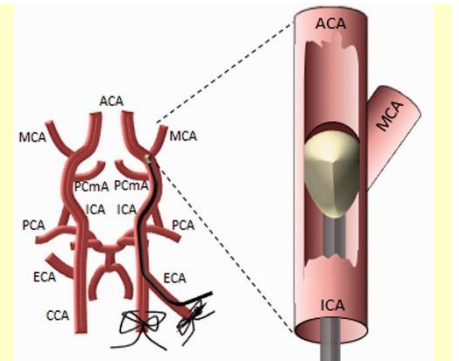


Figure 2: the surgical principle of the intraluminal filament model (adapted from Sutherland et al., 2016)

This model aims to induce an occlusion of the middle cerebral artery, but the severity of occlusion and size of the lesion will vary due to e.g., intra-subject differences in vascular anatomy (collaterals). Whether an animal develops a large or moderate lesion is a chance event. Based on our experience in CONTRAST 1.0, we expect that roughly 20% of the animals subjected to this procedure will develop a lesion that will produce severe discomfort, the remaining 80% will experience moderate discomfort.

E: Intervention

██████████ are two neuroprotective treatments that shown potential for improving histological and functional outcomes in ischemia-reperfusion models. Possible underlying mechanisms include optimization of energy homeostasis by modulation of mitochondrial respiration, reduction of apoptosis and free radical scavenging ██████████ Depending on the mechanism under study, these are applied before, during or after the stroke and are typically given either intraperitoneally (*i.p.*), subcutaneously (*s.c.*) or intravenously (*i.v.*), at appropriate volumes (Diehl et al., 2001). Finally, there will be one placebo group to serve as a negative control for both treatment arm. Although the dosages and timings will not be the same between either treatment arm, ██████████ and ██████████ are basically a peptide and biotin-analogue. There are no specific vehicle formulations to test for efficacy, therefore the placebo will consist of saline injection(s). After careful deliberation, we chose to include only one saline group to save rats and resources.

The timing and frequency of treatment will be based on clinical literature but need to be optimized in a pilot, which will contribute to research question 8 (main proposal).

F & G: (early) sacrifice for post-mortem brain assays

Animals will be killed by a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU. Brains and other tissue of interest will be collected for additional *ex vivo* analyses. Dedicated “post-mortem” groups can be sacrificed for tissue analyses, this may happen at any moment, but typically we terminate the experiment after the first, second or third MRI session. This allows *in vivo* MRI findings from before stroke, before recanalization, and after recanalization to be correlated to *ex vivo* tissue outcomes. These analyses may include immunohistochemical analysis of hypoxia, infarction, inflammation, molecular markers associated with specific microvascular processes and others; biochemical analyses such as oxygenation, oxidative stress; gene expression analysis. Importantly, animals in post-mortem groups will go through every step listed in Table 1 up until sacrifice, no more, no less.

General experimental timeline

We will acquire baseline measurements on primary behavioral outcome parameters (Table 1, **B: baseline behavior**). An MRI session occurs before or shortly after stroke induction (Table 1, **C: baseline MRI or during occlusion**).

Our trained technician(s) (appendix 1: pilot 1b/c) will perform a stroke surgery (Table 1, **C1 or C2: stroke induction**).

We administer the therapeutic interventions (E; placebo/██████████ intravenously or intraperitoneally during and/or after recanalization (D-r). We may also sacrifice a post-mortem group before recanalization, and/or at a certain time after recanalization (F) to validate/compare the effects of recanalization treatment on brain tissue using *ex vivo* assays.

Following recanalization, we will apply multiparametric MRI experiments (*Table 3, C MRI post-recanalization*). This allows us to study the effect of the treatment and recanalization on lesion evolution. By mapping cerebral perfusion and biomarkers of brain health we will investigate a possible mode-of-action for treatment effects. Behavioral testing (B) will precede MRI (where possible, this is not feasible directly after recanalization). Test batteries and MRI (B & C) can be repeated max 8 times after recanalization, to a maximum of 2 sessions per week.

After the final measurement, within three months, the rats will be killed and brain tissue excised for post-mortem analysis via brain assays (*Table 3, G: sacrifice*).

Pilot 2

██████ and ██████ have been administered in lab animals and humans before. The timing and frequency will be based on relevant literature values. However, adequate dosages will need to be determined in a pilot study. We will be informed by the dose-response curves that previous studies on ██████ and ██████ have yielded. This is a critical step before the preclinical trail can commence. For example, it has been shown *in vitro* that the rat's fibrinolytic system is 10-fold less sensitive to recombinant tissue-plasminogen activator (rtPA) than the human system (Korninger and Collen, 1981), so many preclinical studies of rtPA are performed with 10 instead of 0.9 mg/kg rtPA (the recommended dosage in stroke patients). Similarly, we must consider that the physiology of the rat may interact with the efficacy of the ██████ and ██████, thus mitigate the likelihood that we settle on a therapeutically ineffective dose before the experiment begins.

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

We performed a-priori power analyses with G*Power (v3.1.9.7), evaluated by the AwB and statistician.

Based on our experience, the intraluminal filament model of stroke has a maximum attrition rate of ~20%. This is not only due to risk of complications but also insufficient lesion size, meaning that the occlusive device is not always successful in creating ischemia. This sometimes forces us to exclude the animal. Moreover, we expect to lose ~5% of our animals due to repetitive MRI during/after stroke. This is all accounted for in our estimations. These considerations notwithstanding, in CONTRAST-1 we noted that our attrition rates decreased substantially as researchers and technicians became more skilled with the model and experimental workflow.

PILOT

One pilot needs to be conducted where the optimal dosage will be determined. Timing will be adopted from clinical studies. These parameters will be derived from previous *in vitro* and *in vivo* experiments, and we will discuss our protocols with experts. We will use a similar design as described for the main study: brain infarcts are induced using the filament model and the lesion will be measured repetitively, during and after the occlusion. To this end we need 100 rats (50 rats per treatment arm), this number includes attrition estimates and is based on our experience. Using this repeated measures design, when can assess the dose-response for 3 dosages with acceptable certainty. The exact dosages will be decided with colleagues involved in the CONTRAST 2.0 clinical trials.

MAIN STUDY

The estimated number of animals for this study will be based a repeated-measures ANOVA (mixed design), with dependent variable: lesion size regressed against sex and intervention. Power calculations were made for an effect size (f) of 0.25, (no previous data available from the literature), a significance level (α) of 0.05 and a power ($1 - \beta$) of 0.8.

The question is whether the mean change in the outcome from pre to post differed between intervention conditions.

Samples sizes per neuroprotective candidate study are shown below (Table 2). Each study has 6 groups ($k=6$): sex (M/F) and intervention (3 levels: [REDACTED]/placebo). At least 2 repeated measurements of the lesion size will be taken.

POST-MORTEM GROUPS

For each post-mortem group we need a total of 4 animals based on our own experience (attrition not included). Post-mortem group sizes are based on previous literature (Llombart et al., 2017) and our experience. It is not feasible to incorporate post-mortem groups for every condition and every time point of interest, therefore, based on our previous experience, we ask for a **maximum of 40 animals for post-mortem studies**. This number includes an attrition rate of 20%. With these numbers, we can investigate 8 post-mortem groups. The scientific goal of each post-mortem group may vary. Our priority is to identify sequelae of stroke that can inform us on futile recanalization at tissue-level, but we also may use them to disentangle sex effects for example.

Table 2: allocation of experimental animals (main study)

	n	+ attrition rate	Corrected N
3-arm neuroprotection study	60	+ 20%	75
Post-mortem groups	32	+ 20%	40
Total			115

Combining the animals for the pilot studies (100), main studies (75), and post-mortem groups (40), we arrive at a maximum of $100+75+40=215$ rats.

We emphasize that 215 is the **maximum** amount we will ask for this appendix. The attrition rates are based on literature and our experience, but CONTRAST 1.0 taught us it may turn out lower depending on the skill of researchers and technical personnel involved (which may be affected by turnover).

B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rat	Licensed breeder or surplus acquired in-house	2 – 3 months+	215	Male & Female	No	Wistar or Sprague Dawley

Provide justifications for these choices

Species	Rats are the best choice for the stroke models described herein, especially the thrombo-embolic model. Rats are also better amenable to the proposed experimental MRI techniques. More generally speaking, lab rats are a good choice for stroke modeling as they are mammalian and share features with human brains (vascular anatomy (Circle of Willis), neuronal cell types and connectivity patterns), yet they are small, cost-effective, with relatively short lifespans which allows for high throughput studies.
Origin	Commercial licensed breeder or own breeding facility, depending on logistic issues.
Life stages	Adult rats will be used (>3 months old). This study is not designed to assess effects of aging.
Number	The primary goal of this study is to test the effect of two neuroprotective treatments on lesion size in a three-arm preclinical trial. To that end, we need 75 rats at maximum. For the accompanying pilot study, we need 100 rats at maximum (attrition included). This brings us at a total 215 rats at maximum.

Gender	There are well-described sex differences that govern stroke outcome, it stands to reason that this independent variable will interact with other variables to affect study outcomes. Pilot and main studies will be executed in male and female animals.
Genetic alterations	No genetically altered strains will be investigated in this study.
Strain	Strains will be used that are suitable for stroke research, we will consider Wistar or Sprague-Dawley rats. We have ample experience with both these strains.

C. Accommodation and care

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

Yes

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

We strive to provide housing and care are in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU. However, sometimes animals might need to be housed solitarily temporarily in their home cage (max. 72h) to ensure the best recovery as possible after a surgical procedure. After 72h, animals are socially housed. Adverse effects are not expected.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

Surgery: All surgical procedures resulting in pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia.

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

1. Altered movement, paralysis, circling behaviour (function will partly recover within one week)
2. Bleeding
3. Insufficient recovery after surgery (numbness)
4. Wound infection (redness, temperature)
5. Weight loss
6. Effects of therapeutic intervention

Explain why these effects may emerge.

1. The large vessel occlusion will temporarily restrict blood flow to a certain part of one hemisphere. This will result in an infarct and the animal will experience a functional deficit. In turn, animals are hampered in natural behavior **(D)**
2. In rare occurrences, subcutaneous bleeding might be observed as the described models require arteriotomy **(D)**
3. Insufficient recovery (numbness) after surgery may develop as a complication **(D)**
4. Wound infection may emerge after surgery **(D)**
5. Side-effects from therapeutic intervention may occur depending on administration route, but these are not expected **(E)**
6. Depending on the administration route (i.v. requires general anesthesia). Both █████ and █████ have been approved for rat and human consumption, therefore adverse events are not expected **(E)**.

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

1. Rats can compensate these functional losses rather quickly compared to humans, and therefore function will largely recover within the first week of survival. Rats will be euthanized if stroke severity leads to humane endpoints (next section)
2. During surgery and prior to skin closure, the location is observed, and any bleeding is treated by applying pressure, until bleeding stops (normally a few minutes), only then the skin is closed. Bleeding beyond this time point is not expected.
3. Recovery after surgery is optimized by maintaining body temperature during and immediately after surgery (feedback-controlled heated pad, careful disinfecting of the incision area, protection against dryness of the eyes by artificial tears, application of saline to prevent dehydration). Part of the animal cage will be placed on a heating mat to aid recovery after surgery.
4. Wound infection is prevented by proper application of surgical SOPs. Wounds are monitored daily. Use of antibiotics will be considered if deemed appropriate.
5. Liquid food and/or food pellets will be placed inside the cage. Furthermore, in case of exacerbated weight loss, Ringer Lactate or NaCl will be subcutaneously administered if the nutritional status of the animal is deemed insufficient.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

We will apply the same HEP strategy as in CONTRAST 1. Inducing stroke requires vigilance for possible HEPs. The same HEP strategy applies to all animals, i.e., that either are normotensive and hypertensive (hypertension is not expected to lead to severe discomfort that requires a HEP).

Our HEP strategy combines information from two sources: body weight and motility.

We will use an animal motility score to identify the humane endpoint for animals suffering from stroke.

The following motility scores will be assessed in their home cage:

- (0) Normal exploratory behavior
- (1) Slightly reduced exploratory behavior
- (2) Moving limbs without proceeding
- (3) Moving only to stimuli
- (4) Unresponsive to stimuli, with normal muscle tone
- (5) Severely decreased tone, premortal signs.

Animals can lose up to 20% of their weight due to ischemic stroke. Normally, the decline in body weight should decrease and stabilize, and animals should start gaining weight again after three days. If this is not the case, or animals lose more than 20%, we will contact the AwB to discuss whether we should keep the animal or euthanize it (body weight on its own is too crude as an indicator for a HEP). When the animal displays normal behaviour (e.g. feeding, exploring, resistance to fixation by researcher) we can decide to monitor for another day. When behaviour is abnormal (little to no movement, no feeding behaviour, easy to fixate by hand) we will decide with the AwB whether we should apply a HEP.

Indicate the likely incidence.

As a general rule of thumb, this is a rare occurrence in fewer than 5% of the entire study population. During CONTRAST 1.0, the project that preceded this one, these events were extremely rare (<0.01%).

F. Classification of severity of procedures

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

Procedure codes:

1. Large vessel occlusion (D), combined with or without treatment. The prospect of serious stroke symptoms, combined with the surgery and repetitive imaging.

Procedures	Species	Sex	n	Maximum discomfort (cumulative)	Source of discomfort
1	Rat	Both	43 (pilot and main study)	Severe	Cumulative moderate discomfort in each step (A through C). Stroke lesions (D) turn out large due to poor collaterals, and lead severe discomfort in combination with repetitive imaging (C), test batteries and blood pressure measurements (B) and intervention (E). Sacrifice in F and G is a non-recovery procedure.
1	Rat	Both	172 (pilot and main study)	Moderate	Cumulative moderate discomfort in each step (A through C). Stroke lesions (D) turn out mild-to-moderate due to good collaterals, and leads to moderate discomfort in combination with repetitive imaging (C), test batteries and blood pressure measurements (B) and intervention (E).
Total			215	Severe: 20% Moderate: 80%	

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	<p>Candidate neuroprotective treatments detailed in this work will not be tested in the main study before the optimal timing and dosage of treatment has been identified in the pilot study. The dependent variable for this analysis will be lesion shrinkage. We must be able to select the optimal dosage and timing regime, and the lesion should be sufficiently reduced (see main proposal). This is a go/no-go decision.</p> <p>When a “go” has been given, we will proceed with the main experiment. To fully understand and study recovery from stroke, we need to study it in a living brain. Good <i>in vitro</i> or <i>in silico</i> models of the brain and its vasculature that recapitulate the complex interactions between all elements of the neuropil do not exist. Rodents offer a good alternative for non-human primates in studying neuronal function and cognition, with higher throughput. They are mammalian and share similar basic structures (vascular anatomy, neuronal subtypes and connectivity) as human brains.</p>
Reduction	<p>Our technicians will be trained by experts in the field, and instruction videos demonstrating the surgeries will be studied prior to training. One of the technicians already has years of experience with microsurgeries. We plan to perform multiple surgeries per day, allowing us to quickly surmount the learning curve. Experiments will be executed in succession with carefully designed go/no go and selection criteria. Altogether, this is expected to minimize the total number of animals required.</p>

	In this project, MRI is the main imaging method of choice. Non-destructive imaging allows studying the effects of stroke in a mixed (within- and between-subject) design, which reduces the number of rats necessary to reach our goal since each animal can be measured multiple times. Our laboratory has a long history of neuro- MRI in rodents, it is expected that our experience keeps bumping into procedural pitfalls to a minimum, which in turn contributes to a reduction in the number of animals necessary for this project.
Refinement	The procedures described in this project are based on a large body of scientific and experimental knowhow and experience and are performed by highly trained personnel. All imaging experiments and surgeries will be performed under anesthesia. During these procedures, animal physiology (temperature, heart rate, respiration rate, oxygenation and temperature) will be continuously monitored and kept within physiological range. This will minimize stress/discomfort during and after surgical procedures.

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

No

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

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Re-use

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

No > Continue with question I.

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

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

No

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

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Repetition

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

Not applicable.

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Euthanasia of animals after the final serial MRI is necessary to collect brains for post-mortem tissue analysis (immunohistochemistry, transmission electron microscopy or mass spectrometry).

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

No > Describe the method of killing.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Animals will be killed either by an overdose of isoflurane (followed by transcardial perfusion-fixation). Perfusion-fixation is required for immunohistochemistry or electron microscopy. Both methods of killing are acceptable according to Annex IV of Directive 2010/63/EU since the animal will be killed while deeply anesthetized.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

References

- Banerjee C, Chimowitz MI (2017) Stroke Caused by Atherosclerosis of the Major Intracranial Arteries. *Circulation Research*. 120:502–513. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308441.
- Bjorkman ST, Ireland Z, Fan X, van der Wal WM, Roes KCB, Colditz PB, Peeters-Scholte CMPCD (2013) Short-Term Dose–Response Characteristics of 2-Iminobiotin Immediately Postinsult in the Neonatal Piglet After Hypoxia-Ischemia. *Stroke*. 44:809–811. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.677922.
- Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2:396–409. DOI: 10.1602/neurorx.2.3.396.
- De Feyter HM, Behar KL, Corbin ZA, Fulbright RK, Brown PB, McIntyre S, Nixon TW, Rothman DL, et al. (2018) Deuterium metabolic imaging (DMI) for MRI-based 3D mapping of metabolism in vivo. *Science Advances*. 4:eaat7314. DOI: 10.1126/sciadv.aat7314.
- Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Van De Vorstenbosch C (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*. 21:15–23. DOI: 10.1002/jat.727.
- Korninger C, Collen D (1981) Studies on the Specific Fibrinolytic Effect of Human Extrinsic (Tissue-Type) Plasminogen Activator in Human Blood and in Various Animal Species in Vitro. *Thromb Haemost*. 46:561–565. DOI: 10.1055/s-0038-1653411.
- Llombart V, Trejo SA, Bronsoms S, Morancho A, Feifei M, Faura J, García-Berrocoso T, Simats A, et al. (2017) Profiling and identification of new proteins involved in brain ischemia using MALDI-imaging-mass-spectrometry. *Journal of Proteomics*. 152:243–253. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.11.014.
- Oliveira-Filho J, Samuels OB (n.d.) Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke. UpToDate.
- Spencer SJ, Miller AA, Andrews ZB (2013) The Role of Ghrelin in Neuroprotection after Ischemic Brain Injury. *Brain Sciences*. 3:344–359. DOI: 10.3390/brainsci3010344.

- Straathof M, Meerwaldt AE, De Feyter HM, de Graaf RA, Dijkhuizen RM (2021) Deuterium Metabolic Imaging of the Healthy and Diseased Brain. *Neuroscience*. 474:94–99. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.01.023.
- Sutherland BA, Neuhaus AA, Couch Y, Balami JS, Deluca GC, Hadley G, Harris SL, Grey AN, et al. (2016) The transient intraluminal filament middle cerebral artery occlusion model as a model of endovascular thrombectomy in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 36:363–369. DOI: 10.1177/0271678X15606722.
- Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 20:84–91. DOI: 10.1161/01.STR.20.1.84.
- Zitta K, Peeters-Scholte C, Sommer L, Parczany K, Steinfath M, Albrecht M (2016) Insights into the neuroprotective mechanisms of 2-iminobiotin employing an in-vitro model of hypoxic-ischemic cell injury. *European Journal of Pharmacology*. 792:63–69. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.10.026.



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3	Locally breeding genetically hypertensive rats

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.

Breeding animals in a research facility aims to produce enough animals for conducting experiments described in this project license. In some of our studies (appendix 1), selectively bred lines are used, which have a pathological phenotype. The purpose of this application is to enable the breeding of animals with a "refined" genetic background and to provide an appropriate number of animals for high-quality scientific research. Since selectively breeding lines that may exhibit a pathological phenotype or where genotyping is not combined with identification requires a CCD permit, this appendix is intended for breeding rats for that purpose; to establish a line with a genetic predisposition to develop hypertension. An example is the spontaneously hypertensive rat (SHR) or the Dahl salt-sensitive rat (DSS). These rat strains are in good standing with the stroke and hypertension field, and have been used for decades to elucidate causes and consequences of hypertension (Lerman et al., 2019), and we will choose one strain for the entirety of this project. While rats from these lines can be acquired from our preferred suppliers, these lines are unfortunately only maintained in the United States and China. This means that all our hypertensive animals have to undertake a long journey by plane before they arrive at our institution, with all the associated discomfort. The reason we want to establish this breeding line ourselves is to avoid this unnecessary discomfort. Another reason for us to start a colony is the expected high efficiency: we will need both male and female genetically hypertensive rats in our studies, to a ratio of 1:1 (see appendix 1). Maintaining our own colony at a pace we can control, ensures optimal throughput for our experiments, which should produce as few surplus animals as possible.

Thus, this appendix is meant for selectively breeding animals for the overarching project. Some discomfort may occur, either due to the pathological phenotype or due to separate genotyping or phenotyping (monitoring the development of the desired phenotype: high blood pressure). Spontaneously hypertensive species develop hypertension and insulin resistance at an early age (Owens, 2006). Some other known phenotypic abnormalities in these animals include hyperactive behavior (Cortese and Castellanos, 2015). Given the visible phenotypic abnormalities, it is conceivable the breeding of this model could involve some discomfort. It is also known that high blood pressure can lead to progressive kidney damage over time (from 30 weeks onwards) (Hultström, 2012). Therefore, it is conceivable that other metabolic abnormalities will occur. Before starting a line, it will be checked whether the line is already maintained elsewhere within the institution; if so, a decision will be made between obtaining an existing line or starting breeding in-house, in line with AwB Utrecht's policy (<https://ivd-utrecht.nl/nl/infocentrum/document/beleid-aanschaf-en-fok-van-proefdieren>).

For a chosen line, the phenotype will be determined through monitoring (daily and weekly checks) as we perform on all animals in our facility for two generations in accordance with the CCD guidelines (see project proposal document). If welfare impairment or other phenotypic abnormalities are detected, the AwB will be informed, and in consultation with them, the new crossbreed will be classified as breeding with discomfort, and these animals will be registered. Appropriate measures to limit the discomfort will be taken.

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

The intended goal of these experiments is to breed rats with a genetic predisposition to hypertension. There are already several lines with a good reputation that meet this criterion. A breeding pair from one of the available strains will be obtained from a preferred supplier. These will be transported to our institute, and a small colony (that fits our experimental throughput) will be established with them. Additionally, when determining the breeding strategy, careful consideration will be given to whether other measures can be taken to prevent or drastically reduce discomfort.

The offspring that will be used in the experiments will first be checked for the correct phenotype or possibly the genotype. The phenotype will be determined through blood pressure measurements: by measuring systolic blood pressure using a 1) Millar pressure transducer through the femoral artery, 2) telemetry with a sensor implanted in the carotid, or 3) tail cuffs. Of these methods, the tail cuff method is preferred because of simplicity and non-invasiveness. We will only verify hypertension with more invasive methods if the cuff device is inaccurate. The non-invasive tail-cuff method can be performed awake, which requires some training/habituation that can induce mild stress, but another possibility is to induce light anesthesia. The genotype may be determined using an ear notch, where a small piece of the ear is used to isolate DNA for genotyping, and the notch itself can be used for identification purposes (left, right, left-right, etc.). Some animals will be used for further breeding, while others may be used in experiments. Unsuitable animals (e.g., those with an undesirable phenotype/genotype or surplus animals) will be culled or offered as surplus.

In cases where breeding involves discomfort, extra supervision will be in place to ensure that decisions can be made before discomfort occurs.

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

The number of animals for this procedure is derived from our studies (appendix 1): we anticipate breeding 222 genetically hypertensive animals at maximum. These animals are bred for appendix 1, they do not count toward the grand total of animals applied for in this project license. However, we require extra animals, for example the parents of each generation, which will not be used for the studies. In addition, some animals may not exhibit the phenotype necessary for the experiments in this project, i.e., they turn out not to be hypertensive, these animals will end up as surplus. As a zeroth-order approximation, we anticipate that about 50% of the animals may not be hypertensive (enough), so we ultimately request 444 animals **at maximum** for this part of the project.

B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rat	Preferred supplier, to be continued in-house	Adult	222	Male & female	GA	SHR or DSS

Provide justifications for these choices

Species	The advantage of the rat is the existence of numerous genetic strains exhibiting robust spontaneous hypertensive phenotypes. In addition, the rat is easy and cost-effective to maintain, house, and breed yet large enough for most analytical studies, including long-term studies, dynamic cardiovascular monitoring. Because these rat models exhibit many phenotypic characteristics observed in human hypertension, they have been widely used to examine both the genetic and mechanistic bases of hypertension.
Origin	Breeding pairs will be acquired from a preferred supplier.
Life stages	Sexually mature (for breeding). We will not use rats older than the age of 18 months, because SHRs are known to develop progressive kidney damage as hypertension persists throughout the lifecycle. We expect the same damage occurs to DSS rats. Hypertensive kidney damage is not morphologically evident before 30 weeks of age, the damage then progresses with increasing age, but does not generally cause renal failure (Hultström, 2012). The gradual buildup of kidney damage may cause kidney failure, which incurs unacceptable discomfort. We will stay alert to the signs of kidney damage and we will not use animals older than 18 months in our studies to minimize this risk.
Number	To breed primary hypertension rat models for our longitudinal studies 222 rats, plus 222 to account for possible attrition (e.g., incorrect phenotype). Note that in the ideal situation, 222 of the rats in this appendix will be transferred to appendix 1, therefore only the 222 surplus rats count towards the grand total.
Gender	Male and female. There are well-described sex differences that relevant to stroke outcome, which we plan to incorporate in our studies (appendix 1). We include both males and females (1:1 ratio) from this breeding program, we therefore expect surplus to be minimal.
Genetic alterations	To investigate primary hypertension, a genetic hypertension model will be used. As mentioned below, two strains are under consideration. The genome of both these rat strains have been manipulated by selective breeding only.
Strain	Spontaneous Hypertensive Wistar-Kyoto (SHR) or Dahl/Salt sensitive (DSS) rat strain. Choices for these strains are elaborated in appendix 1, which describes the study designs for which these rats are bred.

C. Accommodation and care

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

Yes

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

To avoid extensive individual housing of male breeding animals, we will actively look for "buddy rats" they can be housed with (sterile female or latest male offspring). If this is not possible, these males may be housed solitarily for up to 12 weeks, according to the guidelines of the local AwB (<https://ivd-utrecht.nl/nl/infocentrum/document/beleid-individuele-huisvesting-van-proefdieren>).

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

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

We will take the expected discomfort into account as much as possible based on observations, and contact the local veterinarian and AwB when we observe unintended consequences of breeding. The amount of discomfort during selective breeding of these rats will be low with the refinements applied. Genotyping will only be performed when necessary, e.g., when phenotyping (blood pressure measurements) do not give us sufficient information about the validity of the offspring. Genotyping will be combined with identification (ear notch) as much as possible, unless the notch will not yield reliable results for PCR and other material is necessary (such as blood).

Explain why these effects may emerge.

This application pertains to selective breeding of hypertensive rats where there may be a probable source of discomfort. Expected effects on the rat phenotype are the elevated blood pressure, hyperactivity, and progressive renal damage as the animals continues to age. Also, phenotyping (blood pressure measurements) may induce mild stress due to either handling, training and habituation when measuring awake animals, or induction of light anesthesia to ensure compliance. Possible genotyping (ear punch) or drawing of blood will cause mild discomfort.

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

From the experience of the GDL with breeding animals, maximum refinement will be applied that will depend on discomfort that may be observed. Genotyping will be combined as much as possible with identification, blood collection will only be done if the tissue from the ear notch is not adequate for analytical methods.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

If discomfort, despite refinement measures, is more than mild or occurs earlier than expected, the animals will be terminated prematurely. This will vary by breeding line, depending on the anticipated discomfort. Special attention will be given to behavior, posture, gait/mobility, nutritional condition, grooming condition, unexpected swellings, balance problems, and any breeding line-specific criteria known from previous studies. If, in individual cases, the refinement or reduction of discomfort is not effective, the animal will be removed from the program.

As mentioned in D, it is known the spontaneous hypertensive Wistar develops progressive renal damage starting at 30 weeks of age. Damage progresses with age, but generally it does not lead to renal failure (Hultström, 2012). Nevertheless, it can be expected that renal damage compounds over time and can ultimately lead to renal failure. We will not keep animals in the breeding program longer than 12 – 18 months. We will also remain vigilant of renal failure: if we note the urine of animals starts to turn an unusually dark shade of yellow (or reddish color) we will decide with the AwB to do additional testing (creatinine) and/or whether to apply a HEP. We will also keep an eye on general well-being, e.g., if we see rats with a hunched back, reduced activity, sudden weight loss, or other signs of illness (as outlined on www.humane-endpoints.info) we will decide with the AwB whether to apply a HEP.

Indicate the likely incidence.

Assuming the expected discomfort has been identified, and refinement is possible and maximally applied, we expect less than 5% attrition.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages). Discomfort as described here will be mild (100%) in light of the proposed refinement measures. The breeding strategy will be adjusted such that the likelihood of discomfort will be as small as possible by selecting the best candidates for parenthood by phenotyping.

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	To fully understand and study recovery from stroke in the context of hypertension, we need to study it in a living brain. Good in vitro or in silico models of the brain and its vasculature that recapitulate the complex interactions between all elements of the neuropil do not exist. Selective breeding of spontaneous hypertensive rats will be essential to answer our research questions.
Reduction	We strive for reduction by including both males and females in our study designs, therefore, we expect to use animals resulting from selective breeding in a 1:1 ratio. This means that we expect few surplus animals (that will not be used for experiments) from our breeding program.
Refinement	As it is known that hypertensive rats develop progressive renal damage at adult age (>30 weeks) we will transfer the oldest animals to the experiment as soon as possible, mitigating discomfort before the experiments (appendix 1) begin.

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

No

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

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Re-use

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

No > Continue with question I.

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

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

No

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

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Repetition

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

Not applicable

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Animals without overt discomfort can be used for re-use (training, education) under a different license.

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

Animals used for breeding, and older than 8-10 months, without the appropriate phenotype will be killed. This will be according to regulations that forbid adoption of genetically modified animals.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

No > Describe the method of killing.

CO2 slow-fill method, or another method accepted by EU guidelines.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

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

GGO regulations forbid adoption of genetically modified animals.

References

- Cortese S, Castellanos FX (2015) Chapter 4 - Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. In: Neurobiology of Brain Disorders (Zigmond MJ, Rowland LP, Coyle JT, eds), pp 42–58. San Diego: Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-398270-4.00004-5.
- Hultström M (2012) Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension. 30:1087. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328352b89a.
- Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, et al. (2019) Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. Hypertension. 73:e87–e120. DOI: 10.1161/HYP.000000000000090.
- Owens DR (2006) Chapter 23 - Spontaneous, Surgically and Chemically Induced Models of Disease. In: The Laboratory Rat (Second Edition) (Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, eds), pp 711–732 American College of Laboratory Animal Medicine. Burlington: Academic Press. DOI: 10.1016/B978-012074903-4/50026-1.



Form Project proposal

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3 Provide the title of the project.	The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke: CONTRAST 2.0

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

Acute ischemic stroke (AIS) is a medical emergency where a thrombus or embolus (typically a blood clot) suddenly blocks an artery that irrigates the brain, thereby impeding blood flow (partially or completely) that puts the

downstream brain tissue at risk of permanent damage. There are two approved strategies that attempt to remove the clot, collectively called reperfusion (or recanalization) therapies, to the end of improving the outcome for the patient. The rationale of reperfusion therapy is that the restoration of perfusion to ischemic cerebral tissue is the best conceivable treatment against AIS. *Intravascular thrombolysis*, the breakdown of the embolic clot through enzymatic activity by thrombolytic medication has been the mainstay for AIS treatment since the mid-nineties. Then, in 2014, several trials, including the Dutch MR CLEAN trial (Berkhemer et al., 2015), triggered a breakthrough in AIS treatment by demonstrating that of *mechanical thrombectomy* with the use of a retrievable stent to remove the embolic clot was superior to the gold-standard treatment by chemical thrombolysis alone. However, challenges remain, based on the fact that 50% of patients treated with thrombectomy still died or were functionally dependent at three months later, despite a successful recanalization procedure (Goyal et al., 2016). Similar figures have been reported for thrombolysis (Rha and Saver, 2007). This phenomenon, where patients are recanalized but do not clinically improve (i.e., they are dead or dependent at follow-up), has been termed “**futile recanalization**” (El Amki and Wegener, 2017).

The success of MR CLEAN spurred Dutch healthcare professionals and researchers from university and regional medical centers to unite in the CONTRAST consortium (Collaboration for New Treatments in Acute Stroke) from 2017 until 2022, with the overarching goal to improve the outlook for stroke patients (<https://www.contrast-consortium.nl>). Funded by the Dutch Heart Foundation, Brain Foundation and industrial partners, the consortium spawned multitudes of clinical and translational studies on the subject of different types of stroke.

In 2022, the final year of the first CONTRAST consortium, the Dutch Heart Foundation and Brain Foundation invested once again for the continuation of the consortium. Predictably named “CONTRAST 2.0”, the mission was extended for five years and the goal remains the same: improve the outlook of stroke patients. An extensive and integrated research program has been written that includes new clinical trials and preclinical studies to elucidate stroke pathophysiology. The preclinical program is based on results achieved with the first CONTRAST project license (hereafter referred to as CONTRAST 1.0). **The immediate objectives of the updated preclinical research program are to improve the prognosis for stroke patients by 1) elucidating how secondary processes can thwart the efficacy of recanalization treatment (i.e., futile recanalization), and 2) test the effects of two promising neuroprotective agents that counteract some these secondary processes, [REDACTED] and [REDACTED] which will support a clinical trial ran by colleagues in the consortium.**

Results and lessons from CONTRAST 1.0

As previously stated in the first project application (AVD1150020184985), the risk of poor outcome depends on the following: 1) presence of a large ischemic core at admission that will proceed to infarction but not enough salvageable tissue; 2) failure to adequately recanalize the occluded artery; and 3) incomplete microvascular reperfusion despite adequate recanalization of the occluded artery. The project written for CONTRAST 1.0 was geared towards elucidating and targeting the incomplete microvascular reperfusion hypothesis (3), because at the time, we hypothesized that incomplete microvascular reperfusion was the primary cause for futile recanalization.

For CONTRAST 1.0, we set up and implemented several experimental models, in small and large animals, to assess hemodynamic effects after recanalization, to detect vascular damage and repair following endovascular manipulation, and to evaluate novel strategies for improvement of thrombolytic treatment. The results have shaped new hypotheses, milestones and goals outlined in the current application. 1) we found a wide variety of [REDACTED] responses (not just a lack of [REDACTED] to stroke treatment, which suggested intricate spatiotemporal dependencies with brain tissue and functional outcome [REDACTED]). 2) we did not [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Furthermore, , a clinical trial from CONTRAST 1.0 that tried to counteract incomplete microvascular reperfusion with antagonizing drugs, was terminated early due to safety concerns (van der Steen et al.,

Meta-analyses of ischemic stroke in clinical populations have identified aging and vascular comorbidities, particularly hypertension, as predictors for stroke outcome and futile recanalization (Hussein et al., 2018; Deng et al., 2022). Over the course of CONTRAST 1.0, [REDACTED]

[REDACTED] Previous animal studies have demonstrated striking effects of hypertension on the cerebral circulation and vessel architecture, and have been invaluable to understanding disease processes that lead to worsened outcome from stroke (Pires et al., 2013; Cipolla et al., 2018; Cipolla and Chan, 2020). Hypertension causes inward and outward remodeling of small and large arteries, decreasing lumen diameters and vasodilatory reserve that if prolonged can cause hypoperfusion and hemodynamic compromise. Repeated mechanical stress during hypertension and degradation of elastin fibers in the vascular wall stiffens large arteries and transmits the pulsatile load downstream into the brain parenchyma. Endothelial dysfunction and diminished nitric oxide (NO) are also associated with hypertension that has negative consequences for the brain, including increasing cerebrovascular resistance and diminished autoregulatory capacity. These, and many other effects of hypertension on the vasculature associate with poor vascular function, for which we have to refer to other literature (Pires et al., 2013; Cipolla et al., 2018; Cipolla and Chan, 2020) which predisposes hypertensive subjects to poor outcome in spite of treatment (i.e., futile recanalization). Still, it remains unclear how exactly reperfusion abnormalities are triggered by hypertension, and how they affect brain tissue after AIS treatment. In CONTRAST 1.0 we [REDACTED]

[REDACTED] Our previous study was not designed to explain *how* [REDACTED] lead to tissue death or recovery after stroke, but we hypothesize that certain [REDACTED] to cause [REDACTED] or recovery. Collecting information on [REDACTED] after AIS is thus another important priority of this project (see hypotheses under 3.2.1).

Given that hypertension is the most common chronic disease in the world, it is important we reveal the microvascular processes that cause incomplete reperfusion and tissue death after AIS, but also shedding light on underlying processes responsible for tissue recovery, even though some tissue appears abnormally (excessively) perfused after treatment. Furthermore, since hypertension destroys basic functionalities of the vasculature, we expect there to be immediate and long-term consequences for [REDACTED] and homeostasis. As explained above, we expect AIS, hypertension, and brain function ([REDACTED] and [REDACTED] status) to interact and decide treatment outcome, but this has not been investigated in comprehensive and translational longitudinal MRI studies as proposed here.

Adjunct treatments that may avert futile recanalization by protecting cerebrovascular function

Both [REDACTED] affect pathomechanisms that involve cerebrovascular function, and aim to ameliorate them. Briefly:

- [REDACTED] is a naturally occurring hormone and mildly excitatory neurotransmitter that plays an imported role in cellular energy homeostasis. It is mainly known as the [REDACTED]', since an increase in [REDACTED] blood levels leads to feeling hungry. [REDACTED] passes the blood brain barrier and acts like a mildly excitatory neurotransmitter with its own, specific receptor sides in various brain areas. [REDACTED] has various neuroprotective effects that make it attractive as an intervention after brain insults (Spencer et al., 2013; Jiao et al., 2017). Furthermore, [REDACTED] has beneficial effects on cerebrovascular functioning, including amelioration of endothelial damage (Mohaddes et al., 2017; He et al., 2024) and angiogenesis after ischemia (Katare et al., 2016). We expect these beneficial effects on cerebrovasculature can potentially avert futile recanalization by sustaining the penumbra, hence this compound was chosen for further investigation in the current CONTRAST 2.0 program that pertains to cerebrovascular functioning in the context of reperfusion therapy.

- [REDACTED] is a biotin analogue and a selective inhibitor of neuronal and inducible nitric oxide synthase (NOS). After hypoxia/ischemia, nitric oxide (NO) is synthesized through the action of constitutive NOS isoenzymes, i.e. the neuronal, inducible and endothelial nitric oxide synthases. Selectively blocking the harmful neuronal and inducible NOS by [REDACTED], represents a new strategy in the treatment of injury after cerebral hypoxia-ischemia. Using this approach, endothelial NOS (eNOS) production is unaffected to maintain cerebral blood flow and prevent hypoperfusion of the already ischemic brain. Published reviews provide more detailed overviews of the mechanisms of action of [REDACTED] after cerebral hypoxia-ischemia (Albrecht et al., 2019). Safety, tolerability and neuroprotective properties of [REDACTED] have been established under *in vitro* [REDACTED] and *in vivo* conditions in rats [REDACTED] and humans [REDACTED]. Because [REDACTED] inhibits the production of NOS, which protects the (micro)vascular functioning in cardiovascular disease (Melikian et al., 2009; Roy et al., 2023), it was chosen as a candidate drug for further testing in the CONTRAST 2.0 program.

Proposed methods

Briefly, in the same vein as CONTRAST 1.0, we are planning a series of experiments to interrogate key outcome parameters at critical time points, meant to answer new hypotheses about AIS sequelae that are decisive for later recovery (for details see 3.4). We continue using **in vivo MRI** as the primary readout method in these experiments, in conjunction with *ex vivo* brain assays, for mechanistic research¹ into brain tissue recovery or detriment. We will integrate animal models of stroke and vascular comorbidity with novel multimodal MRI techniques that reveal cerebral tissue damage, [REDACTED] and [REDACTED] derangement (**methods detailed in 3.4**) to answer specific hypotheses about futile recanalization (**hypotheses detailed under 3.2**). In addition, we will test the effect and the mode-of-action of two compounds [REDACTED], that improve cerebrovascular function outcomes, quantified with MRI techniques, for our consortium partners who are preparing early-phase clinical trials.

Impact on the field

Some expected yields of this project are:

- Insights into underlying mechanisms of futile recanalization after AIS
- Possible therapeutic avenues that can avert futile recanalization after AIS
- Advanced MRI techniques that are successfully tested preclinically find (accelerated) passage for application in human stroke diagnostic imaging
- Elucidating the efficacy and a mode-of-action for [REDACTED]

3.2 Purpose

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

- If applicable, describe all subobjectives

¹ In this application, phrasing like "*mechanistic research*" refers to the endeavor to uncover processes that explain how certain phenomena (futile recanalization) may come about, e.g., what "mechanism" is responsible for brain tissue to progress to infarction after AIS treatment? The term "mechanistic" has various connotations for various professionals, and exact interpretation of this word is frequent cause for discussion. Medical doctors, who observe faltering cerebral oxygen metabolism after AIS, previously unknown to them but made visible with MRI, can consider this a mechanistic explanation for why their patient deteriorates. On the other hand, some disciplines conflate "mechanistic science" with the study of molecular pathways using strictly molecular assays, and regard methods that yield "higher-level" explanations to be merely "descriptive". All things considered; it is expected that some will object to how those terms have been applied here. However, readers are urged not to be distracted, and consider that the *exact* meaning of "mechanistic and "descriptive" – while epistemologically related – depends on the field wherein they are used, and therefore any perceived demarcation between the two may be considered a matter of personal preference (Casadevall and Fang, 2009).

The overarching final goal of this project is to improve the outlook for stroke patients by unraveling the cascade of secondary events after recanalization, identifying new mechanism-based biomarkers of futile recanalization and reveal the effects of (combinatory) treatment with selected neuroprotective agents. We currently specify two goals in two separate appendices:

The direct objectives for the present research project are:

1. Identification of characteristics of futile recanalization from the relationship between macro- and microvascular [REDACTED] brain function and lesion outcome in different models of ischemic stroke and associated risk factors
 - a. Identify vascular factors that explain post-recanalization perfusion deficit in hypertensive stroke subjects
 - b. Identify factors that determine progress of perilesional tissue towards recovery or infarction in the subacute phase

We hypothesize: 1) Hypertension affects cerebrovascular function and predisposes to futile recanalization after AIS treatment, 2) incomplete reperfusion is an underlying mechanism of this futile recanalization in hypertension, 3) [REDACTED] and cerebrovascular malfunction co-localize with [REDACTED] [REDACTED] 4) a better understanding of these processes will open up new possibilities for treatment in the acute and sub-acute phase of stroke.

2. Determine the efficacy and mode-of-action of [REDACTED] and [REDACTED] combined with recanalization after AIS

We hypothesize that: 1) [REDACTED] improve AIS outcome, 2) the mode-of-action of these compounds involves support of cerebrovascular functioning

Our CONTRAST 2.0 program application has specified additional goals, but we await additional funding to realize them. We will request permission for these experiments through an amendment when funding has been procured.

3. Determine the efficacy and mode-of-action of minimally invasive hematoma removal after intracerebral hemorrhage
4. Identify biomarkers that predict long-term (chronic phase) functional outcome after recanalization

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The overarching aim of CONTRAST is to improve outcome of patients with stroke by creating a consortium that blends mechanistic, basic scientific projects with pragmatic randomized clinical trials with a firm view of the future of Dutch Stroke Research beyond the coming five years. The consortium leverages a long-term national collaboration of basic and clinical researchers from multiple disciplines (neurology, neurosurgery, radiology, rehabilitation medicine, geriatric medicine, hematology, epidemiology, and engineering). The consortium has expressed its desire to advance insight in the complex pathophysiological mechanisms following AIS and the effects of neuroprotection by implementing, validating, and integrating preclinical research approaches and mathematical prediction models based on translational read-outs from imaging and biomarker data obtained from animal models. The integration of the animal and mathematical models with patient data from randomized clinical trials (RCTs) allows for the understanding of patient-specific responses and has the potential to optimize clinical decision-making. This project will be a joint effort between multiple laboratories: each party will carry out the experiments and analyses in which they are specialized, thus the workload will be shared and the completion of the project within the maximum of five years remains feasible.

Our research group has a long history in neuroimaging of pathophysiology and recovery mechanisms in different animal models of stroke ([REDACTED]). Furthermore, our team has experience with image analyses and predictive modeling in animal models and patients ([REDACTED]). Animal models described in this research proposal were already established during the previous CONTRAST 1.0 project; these will be applied and, if necessary, refined in the current CONTRAST 2.0 project. Our group owns two small-animal MRI scanners, and we closely collaborate with researchers and technicians from the University Medical Center Utrecht who operate the advanced MRI scanner meant for humans. One small-animal MRI scanner in our lab is also equipped with the same software used to operate the human scanner. These features allow us to harmonize experimental parameters more easily between humans and rodent studies; it will benefit our efforts to port code (to run MRI exams) between these systems to enhance the translational capacity of our findings.

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

No

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

[Click or tap here to enter text.](#)

3.3 Relevance

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

Societal relevance

In 2019, AIS accounted for 62.4% (7.63 million) of all new strokes worldwide, which remains the second-leading cause of death (Feigin et al., 2021). The same year in the Netherlands, roughly 30.000 individuals were admitted to the hospital due to first-time AIS, of whom 18% died (de Boer et al., 2020), the remainder survived with probable functional disability. With a growing and aging population, it is expected that the prevalence of AIS will continue to rise the coming decade (Fan et al., 2023). The overarching aim of “CONTRAST” is to improve the treatment and outcome of patients with acute ischemic stroke. While there are two therapies available against AIS, treatment response varies widely between patients, and “futile recanalization” is a looming and incompletely understood outcome that still leaves the patient dead or dependent after three months. Through this proposal, we will advance insight in the complex pathophysiological mechanisms following acute ischemic stroke using translational read-outs from imaging and biomarker data. Tissue and blood samples from the animal studies will be stored and analyzed in a CONTRAST-biobank, which will also hold blood and thrombus samples from patients in clinical trials. Moreover, imaging data will be collected and stored centrally together with imaging data from the clinical trials. The integration of the animal studies with patient data from clinical trials allows for the understanding of patient-specific responses after thrombectomy and thrombolysis. Collectively, the outcomes of these studies have the potential to optimize clinical decision-making.

Scientific relevance

At present, there is an intense search ongoing to reveal what drives futile recanalization, and many determinants remain unknown. Our previous studies have indicated that various reperfusion responses can arise after recanalization treatment in patients and animal models, studies will increase current insights on the relationship between the degree of (microvascular) reperfusion and lesion development after recanalization. Moreover, we will work together with another group in the consortium to establish whether two high-potential adjunct treatments to reperfusion therapy are able improve stroke outcome in preclinical models.

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

Experimental animals: For the projects described in this CCD, we will have to use animals to test hypotheses and answer our research questions. Therefore, this group is also one of the stakeholders, with negative interest.

Basic researchers: new insights are direly needed concerning the underlying mechanisms of stroke and effects of treatment.

Clinical researchers and physicians: there is an unmet need for (more) effective treatment options which can be combined with existing protocols to improve patient outcome. Unfortunately, all clinical trials of candidate neuroprotective drugs have failed up to now, the failures are partly due incomplete knowledge of the events during and after stroke onset.

Patients and their family: Patients will benefit indirectly from the knowledge gathered within this project, since new basic knowledge will lead to new treatment targets and strategies which thereafter can be translated towards the clinical setting, with the ultimate goal to reduce patient burden after a stroke. Reducing stroke burden, will also have a direct positive effect on the patient's family and environment, since reduced burden will lead to more patient independency and therefore less care is needed from surrounding people.

Medical companies: Pharmaceutical and medical device companies will also benefit from the yields of this project, which can contribute to novel therapeutic target identification, possible compound manufacturing or making existing therapies more efficient by combining multiple (new) treatment options.

Society: Eventually, if we can find new treatment targets and strategies, we can improve patient outcomes after a stroke, and so decrease the burden for the patient and his social environment. This will also eventually decrease the total economic and societal burden.

3.4 Strategy

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

The central hypothesis of "CONTRAST" is that in patients with ischemic stroke and successful recanalization of the occluded artery, outcome is determined not only by the extent of tissue infarction at the time of recanalization, but also by secondary factors leading to treatment futility. CONTRAST 1.0 has illuminated several of these factors (see 3.1), which are subjects of further study in CONTRAST 2.0.

As described in 3.2.1, this application currently aims to achieve two **direct objectives**:

- 1) Identification of characteristics of futile recanalization from the relationship between macro- and microvascular [REDACTED] brain function and lesion outcome in models of ischemic stroke and vascular risk factors
- 2) To study the mode-of-action and efficacy of two neuroprotective candidate drugs, [REDACTED] and [REDACTED]
[REDACTED]

The small animal models set up in CONTRAST 1.0 will continue to be used and further developed for this purpose. We will also incorporate commonly applied or high-potential adjunct therapies in these models, to study their potential and mode-of-action in averting futile recanalization. To operationalize futile recanalization for rodent imaging studies, in most simple terms, we will compare the lesion size during induced ischemia with the lesion size after treatment: if the lesion has grown after recanalization, it may be deemed futile. If lesion growth is negative, recanalization therapy has been successful. The primary outcome parameter will be supported by various secondary outcomes that reflect important aspects of behavior, brain health and [REDACTED] (see below).

Primary readout method: in vivo MRI

To study the interactions in the brain between [REDACTED] tissue death, we plan to integrate the following MRI experiments:

1. As in CONTRAST 1.0, we will employ mature and well-established MRI methods to quantify [REDACTED] and tissue death.

2. cerebrovascular reactivity by gas challenge (CONTRAST 1.0), which allows us to repetitively study the effect of stroke and hypertension on vessel function (Siero et al., 2013).
3. Importantly, we will employ techniques that allow us to quantify tissue [REDACTED]
 - MRI of oxygen [REDACTED] is an emerging technique that allows characterization of the oxygen extraction fraction (OEF). Substantial perturbations or alterations to OEF are thought to underlie malignant processes in brain disease, therefore the OEF may be a useful MRI-based biomarker in tissue health (Biondetti et al., 2023), which we will use to study futile recanalization.
 - Deuterium [REDACTED] imaging, another emerging technique, enables characterization anaerobic glycolysis in cells (De Feyter et al., 2018; Straathof et al., 2021). Pilot experiments during CONTRAST 1.0 indicated that despite successful recanalization; this process may persist or recur in post-ischemic tissue, which could be an important contributor to futile recanalization.

These MRI techniques produce high dimensional datasets (images). In order to test our hypotheses, we will extract lesion sizes, volumes and/or magnitudes of [REDACTED] abnormalities, [REDACTED] and other quantitative information from these images. In addition, we incorporate a limited amount of small experimental groups that will be sacrificed before the endpoint of the experiment, during critical events in the ischemic cascade (e.g., during ischemia or after recanalization). These so-called “post-mortem” groups will be used for ex vivo tissue analysis, which will yield readouts of important tissue parameters that will be used to correlate/validate our imaging findings. These post-mortem are necessary to answer secondary hypotheses regarding imaging findings and the progression of ischemic stroke.

These analyses play a central role in answering our research questions and some of our primary (non-pilot) **go/no-go moments**. For examples on how MRI data are used to answer research questions in AIS research, please refer to earlier CONTRAST 1.0 papers ([REDACTED]). For an example how the MRI method can answer research questions and go/no-go moments, see 3.4.2.

Dissecting the role of hypertension in stroke and futile recanalization

In this project, we are aiming to get a better understanding how hypertension-associated vascular factors, quantifiable with MRI, contribute to futile recanalization. Critically, where previous studies have characterized the effects of hypertension on vessel structure and function with *ex vivo* methods, we will collect information on the interaction between stroke and hypertension using *in vivo* MRI methods.

Imaging data from clinical trials and preclinical studies will be collected and stored in a database. Moreover, blood and tissue samples from patients and animals will be stored and analyzed in a dedicated biobank. All of this data will be combined to identify imaging-, blood- and tissue biomarkers that can predict immediate treatment success and primary and secondary outcome in a patient-specific manner. This biobank data can be used to reveal novel targets for new treatment strategies.

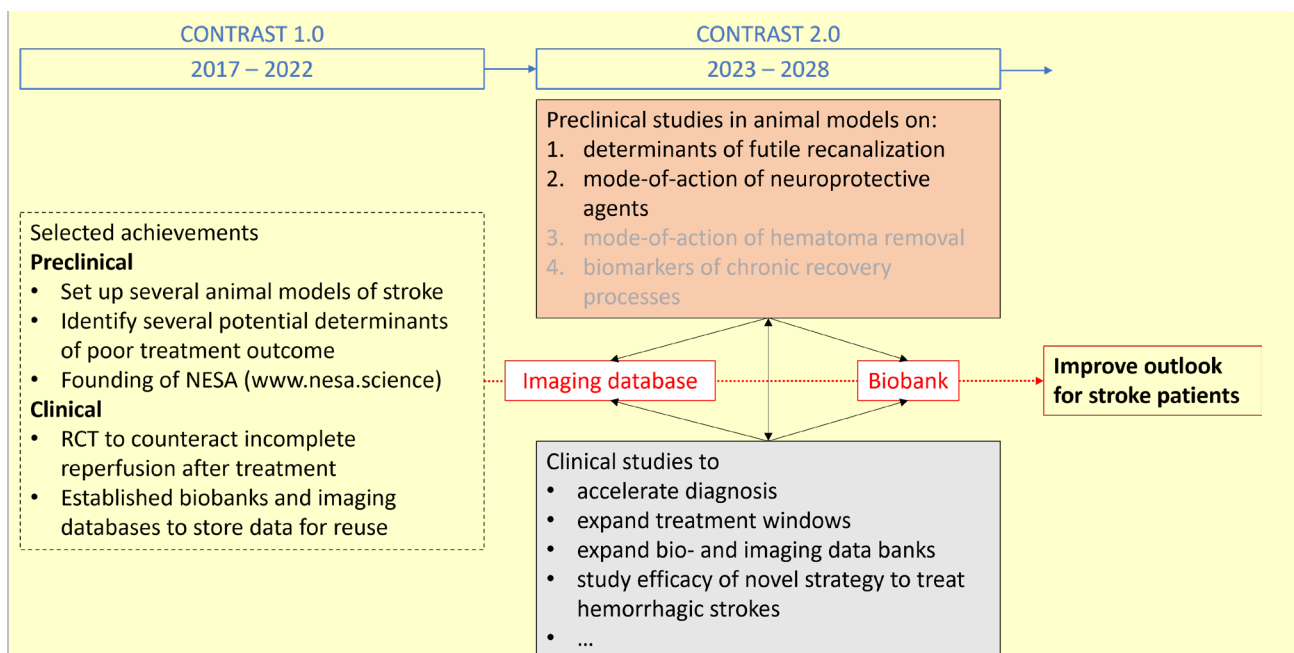


Figure 1: schematic overview of the CONTRAST 2.0 research program. The orange box shows immediate goals relevant to this license application. Grey numbered lines are goals (sub-projects) that still await funding, these will be applied for in a future amendment.

Table 1: to reach our objective we address an array of research questions (RQs) throughout this project. These RQs encompass the hypotheses outlined under 3.2.1. The general workflow in which the RQs will be addressed is shown in Figure 2.

- 1) Training and optimization of models and experimental workflow
- 2) How does recanalization after stroke affect lesion evolution (futile recanalization)?
- 3) Does lesion evolution coincide with [redacted] after stroke?
- 4) Do these [redacted] coincide with perturbations in MRI markers of brain health?
- 5) Do these observations (RQ2-4) depend on risk factors incorporated in the model?
- 6) What are the underlying cellular/molecular mechanisms?
- 7) Can we improve outcome (avert futile recanalization) by therapeutic intervention?
- 8) What is the best timing and dosage for such intervention?
- 9) Does the efficacy of the intervention depend on risk factors incorporated in our model?

To achieve the first objective (appendix 1) plan to achieve the direct objective by running four complementary sub-studies in four models that recapitulate different aspects of ischemic stroke (large vessel occlusion and recanalization) and hypertension (Figure 2).

- We employ two **stroke models**, the
 - a. **intraluminal filament model**, characterized by rapid and effective recanalization (akin to mechanical thrombectomy treatment)
 - b. **embolic model**, characterized by occlusion of embolic source (often a blood clot), and gradual recanalization with a thrombolytic (similar to how patients are treated by intravenous thrombolysis).

As mentioned in the *Background* section, the likelihood of futile recanalization co-depends on various factors that represent the diversity of the stroke population and features of disease etiology. In these stroke models, we can model time-to-reperfusion, embolus composition, along with the effects of sex and aging. Incorporating

these factors as experimental conditions will help us disentangle their contribution to the risk of futile recanalization (see appendix 1 for details).

- Stroke models are combined with two models of **hypertension models**, that uniquely recapitulate vascular damage originating from hypertension of **primary** or **secondary** origin, which will be relevant to stroke outcome. Risk factors for primary hypertension include advancing age, obesity, high dietary NaCl consumption. Secondary hypertension encompasses a smaller (20%) but still common fraction of treatment-resistant hypertension cases, caused by damage to renal vasculature or endocrine organs (Lerman et al., 2019).
 - a. **Primary hypertension** has been modeled in animals by selective breeding in rats, which created a genetic predisposition towards abnormally high blood pressure. For this, we employ either of two widely used strains: the spontaneous hypertensive rat (SHR) or the Dahl salt-sensitive rat.
 - b. **Secondary hypertension** is recapitulated in models of induced hypertension, meaning wild-type animals undergo a procedure that leads to high blood pressure. Two relevant models of hypertension we identified involve **renovascular clipping** or **long-term angiotensin-II infusion**. The invasiveness of both models varies but discomfort is roughly the same due to the length of the procedure (one-time invasive vs. several weeks mildly invasive).

Of note, genetically manipulated animals under consideration for our studies are currently only available from commercial sources on other continents and transporting all of them to the Netherlands will incur significant discomfort that can be avoided. We plan to breed them ourselves instead (see Appendix 3).

The ischemic stroke and hypertension models are combined (2 · 2). Both AIS models and hypertension represent different treatment strategies in stroke and different hypertension etiologies, and each combination is expected to yield new information on how stroke treatment and hypertension interact. Thus these four model combinations yield four separate studies:

- Study 1 = intraluminal stroke & primary hypertension
- Study 2 = intraluminal stroke & secondary hypertension
- Study 3 = embolic stroke & primary hypertension
- Study 4 = embolic stroke & secondary hypertension

See appendix 1 for details. Each study will be assessed by the same array of research questions (RQs, specified above).

To tackle the second objective (appendix 2), we will set up a preclinical trial with the intraluminal filament model. This objective prioritizes the assertion of a treatment effect, therefore only RQ7-9 are investigated (Figure 2).

In a third appendix, we describe a procedure to locally breed a strain of rats that spontaneously develop hypertension (the “spontaneous hypertensive rat” of primary hypertension described above). These rats will be used for studies on Study 1 and Study 3. This strategy will significantly reduce transport-associated distress/discomfort, as will be argued therein.

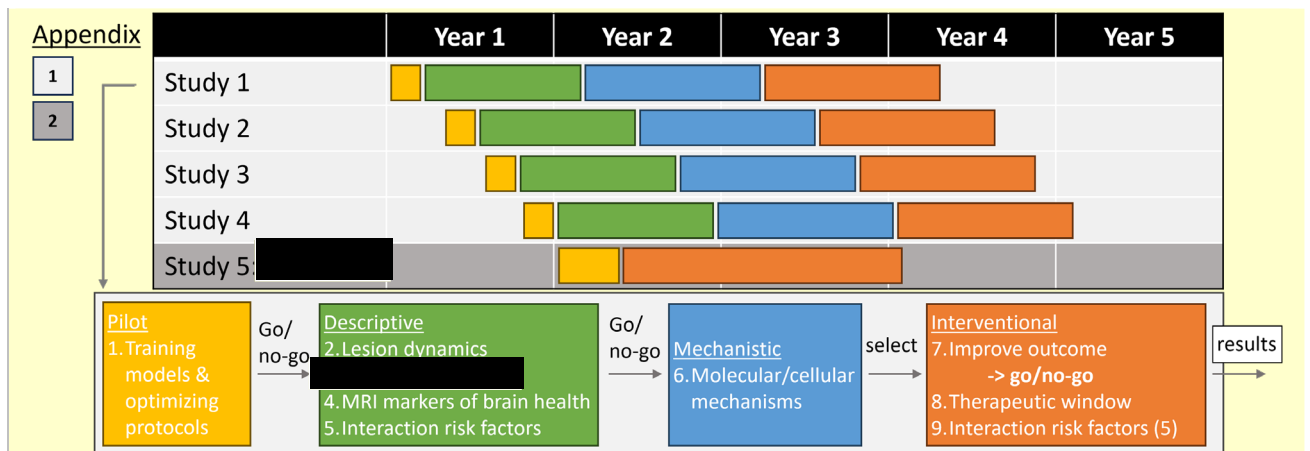


Figure 2: project flow. Upper panel: Gantt chart of the project, split into four sub-studies of model combinations (specified above and in Appendix 1) and a fifth study neuroprotective drug effects of [redacted] and [redacted]; see Appendix 2). The colored blocks represent expected components of each sub-study, and the colors correspond to research questions (RQs; see also Table 1) specified in the lower panel. The number of the appendix corresponds to the direct objectives specified under 3.2.1. Lower panel: illustrates the research questions (RQs) that will be addressed to achieve the immediate goals. For each sub-study, we address the RQs sequentially, except for the [redacted] trial, where interventional RQs are prioritized. Go/no-go criteria are listed below, per appendix.

NOTE: the time frame shows an indication of the project flow, but certain elements may be adapted, e.g., the sub-studies may be executed in a different order or at a different moment during the duration of the license.

We start by implementing and optimizing the workflow and technical skill necessary for each stroke- and hypertension model (RQ 1). Each pilot (Figure 2: yellow bars) is meant to teach technical skill is set up as **go/no-go** mechanism: a “go” is given for the rest of the sub-study, only if sufficient technical skill has been reached (i.e., microsurgery is consistently being completed successfully within the appropriate model-dependent time limit). We note that two stroke models proposed in appendix 1 are already established at our lab, we expect that additional training for our technician will not be necessary, unless another technician joins the project (because of personnel turnover). We also expect the attrition rate to be lower than literature estimates, detailed in appendix 1. For study 3 and 4 we expect pilots will not be necessary, as training for the required procedures have been covered already during the preamble for sub-studies of study 1 and 2.

Next, we study the effects of recanalization on lesion evolution, cerebral [redacted] and imaging markers of brain health/function, most notably cerebrovascular reactivity and oxygen extraction fraction (see list of all techniques on page 4), (RQ 2-5). An association should be revealed between lesion development and MRI markers of brain health, or we will not continue with mechanistic and interventional studies (**go/no-go**).

If results from the descriptive RQs indicate a relevant mechanism that affects stroke outcome, we proceed by assessing possible underlying molecular or cellular processes (RQ 6). Post-mortem brain assays (e.g., immunostaining, mass spectrometry) will be crucial to test secondary hypotheses about underlying molecular mechanisms.

If these experiments result in the identification of targets for interventions, we will proceed with experiments that aim to mitigate or avert futile recanalization through these targets (RQ 7-9). Promising clinical impact and a realistic treatment window that can be translated to patient care are important conditions for these experiments. Therapeutic interventions address RQ 7-9 (treatment) where we seek strategies that have translational potential. We are not asking for a “carte blanche”: these therapeutic agents must be proven safe for administration in both rats and humans. Candidate drugs may already be in clinical use for other purposes, such as vasodilating antihypertensives and anti-inflammatory agents, but adjunctive oxygen treatment is also considered (see Appendix 1 for details). The goal of this

inquiry is in line with the emerging focus on the repurposing of clinically approved drugs as a strategy to novel treatment avenues for AIS (Spellicy and Hess, 2022).

The objective for the preclinical trial of [REDACTED] and [REDACTED] is to assert efficacy and mode-of-action, and will therefore only be focusing on RQ 7-9. While (preparations for) early-phase clinical trials that test [REDACTED] and [REDACTED] for efficacy in AIS are already underway, we have extended our preclinical research program with a preclinical trial that will test not only the efficacy of these compounds in a controlled laboratory setting, we also plan to answer hypotheses regarding the effects that protect cerebrovascular functioning after AIS treatment in our models, that in turn may ameliorate or avert futile recanalization. Our preclinical studies will be preceded by short pilot to optimize the dosage of [REDACTED] and [REDACTED] for rats.

Go/no-go criteria

Appendix 1

1. Pilots

- a) In pilot 1a (RQ1), we will develop and implement a multiparametric MRI protocol that will be employed in studies 1 – 4. We will only start with the following pilots and main experiments once we have obtained interpretable data from our sequence (i.e., the non-background SnR should be >18 dB).
- b) Pilot 1b (RQ1) involves training of research technician(s) to induce vascular comorbidity caused by hypertension. For training we will consult experts and protocols published in peer-reviewed journals. We only proceed with a particular model of inducible hypertension to RQ2 (Figure 2) when the technician is able to perform surgery within the time limit (e.g., 45 minutes), and hypertension must develop within the expected time period of one month.
- c) Pilot 1c (RQ1) involves training of research technician(s) to induce ischemic stroke. At the time of writing, the ischemic stroke models described in this application are already established in our lab. Nevertheless, we may hire new research technician(s) that need to be trained in these models, therefore we still apply for a pilot phase. We will only proceed answer RQ2 (Figure 2) and beyond when the research technician to perform stroke surgeries if they are able to successfully complete the surgery (i.e., produce an ischemic lesion in the expected location) within the allowed time of 45 minutes.

2. Main studies

- a) We will only proceed with mechanistic and interventional research questions (Table 1 and Figure 2; RQ6-9) in a particular model (study 1-4) if we are able to detect a biologically relevant **association between lesion development and MRI markers of [REDACTED] and metabolism**. In practice, this means we should find a relationship between lesion volume, occlusion time, and area of [REDACTED] disturbance between the first MRI and follow-up, with an effect size of ≥ 0.25 . See Figure 3 for example data.
- b) Based on answers found to RQ2-6, we select an intervention for a particular model combination (study 1-4) with potential for translation to patient care for treatment of the pathology and mechanisms under investigation. If the selected intervention does not improve the outcome to a degree that is clinically relevant, we will not continue to investigate RQ8-9. Shrinkage of MRI-based pathology by 30% compared to control was deemed clinically relevant by the consortium.

Appendix 2

Candidate neuroprotective treatments detailed in this work will not be tested in the main study before the optimal timing and dosage of treatment has been identified in the pilot study. The dependent variable for this analysis will be lesion shrinkage. Before study 2 can commence, we should establish in pilot 2:

1. The most optimal dosage and frequency (timing) regime by comparison.

2. The best option (decided above: 1) must reduce the lesion pathology more than 30% compared to the control group. This reduction has been deemed clinically relevant by the consortium.

Appendix 3 does not answer a scientific question, the sole purpose to breed rats for appendix 1, therefore go/no-go criteria are not applicable. We will comply with the guidelines for breeding as prescribed by the local animal welfare body ([Aanschaf en fok van proefdieren | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht \(ivd-utrecht.nl\)](#)). These guidelines also imply that, if a licensed breeder starts offering our strain of interest in Europe, we will not breed these animals ourselves and buy them from the licensed breeder instead.

The decisions made to advance to the next RQ, or stop assessment of the model altogether, are the milestones of each study in Figure 2.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Necessity of animal models

The most important reason why this research has to be conducted in animal models is that our hypotheses are very challenging, if not impossible, to study in stroke patients. AIS is a medical emergency where treatment of the patient is paramount and must occur as soon as possible. Examinations (imaging or otherwise) that do not contribute towards this goal (following the mantra “time is brain” (Gomez, 1993)) are remediated from the clinical workflow (“standard-of-care”), and as a result, there is a paucity of human data from the early hours of AIS after treatment, which is the most critical time point to our hypotheses of futile recanalization. Other reasons for the use of animal models are unique opportunities to perform mechanistic research in a controlled environment (patients cannot be scanned at exactly the same time points after AIS), the ability to assess ex vivo tissue samples after the experiment, and to test new non-invasive MRI sequences treatment paradigms that are not yet clinically in use.

General workflow and decision moments

The central hypothesis of this project is that identifying causes and consequences of secondary vascular events following recanalization, and testing the beneficial effects of candidate neuroprotective drugs, will provide new leads for therapeutic interventions. Considering the unknowns in this field, our strategy is to broadly observe (RQ 1-5) and then narrow down to underlying mechanisms that associate to futile recanalization beyond reasonable doubt. If these experiments yield information on therapeutic targets, we will attempt a clinically relevant intervention strategy (RQ 7-9). The order of these experiments, and resulting decisions, safeguard the translational potential and feasibility of the project.

We will not start answering the RQs before all the necessary elements, i.e., technical/surgical skills and imaging protocols, are in working order. The preclinical trial in appendix 2 will not commence before dose-response pilots have been completed.

The stroke models described in the appendices have been up and running for years in our laboratory, and we do not expect significant training is necessary to perform this element of the study. The inducible hypertension model will need a pilot phase, but these models are relatively straightforward to set up (compared to a stroke model). We will do this with consulting experts.

Choice of stroke models

We will employ the intraluminal filament and embolic model of stroke, because:

1. during CONTRAST 1.0, we found that **these models recapitulate futile recanalization** (poor stroke outcome despite successful treatment, quantified using lesion size before and after treatment).

2. these models recapitulate two different but clinically relevant etiologies and treatments of stroke that are relevant to recanalization efficiency and futile recanalization.

Researchers in the field are currently also working on a new rat models for stroke. For example, a new stroke model for small brain infarction has been developed by colleagues (van der Wijk et al., 2019). Also, in recent years, there has been increasing interest in developing awake stroke models, because there is a growing body of evidence demonstrating that anesthesia during stroke can mediate disease outcome (Hoffmann et al., 2016; Franx et al., 2024c). In case a breakthrough in this field produces a more relevant model of clinical ischemia-reperfusion, we may include this new model in our studies as well. Although an ischemic stroke is not painful to the brain (the brain is not nociceptive), we will not apply such a model if there are indications that discomfort will be higher than “severe”.

Choice of hypertension models

As explained in the background section, we found indications of the relationship in our own data, featuring a model chronic hypertension and AIS (), but there are also other reports from the literature. There is a wide array of hypertension models to choose from and each model recapitulates features hypertension in a slightly different way (which has consequences for the inferences we can make) but we have narrowed down our options to the following well-established models:

1. To model **primary hypertension**, we choose the spontaneous hypertensive rat (SHR) or Dahl salt-sensitive rat (DSS): The former develops high blood pressure spontaneously and is widely used in the field (Lerman et al., 2019), the latter strain needs a trigger by high-salt diet, which can be representative of certain Western-style diets that associate with hypertension and stroke (Lerman et al., 2019). Both models are well-established and lead to increased blood pressure, kidney damage and vascular remodeling processes.
2. To model **secondary hypertension**, we chose renovascular clipping or long-term angiotensin-II injection. The former is achieved by reducing blood flow to the kidneys with a clip in a one-time surgery, the latter model is widely used and achieved by long-term infusion of angiotensin-II with and osmotic mini-pump. Further details can be found in appendix 1. Both models lead to increased blood pressure and vascular remodeling, but importantly, they represent different origins of hypertension found in the human population.

We will consult with experts in the field which model of hypertension is most appropriate to combine with the ischemic stroke models.

Combining models of ischemic stroke and hypertension.

Animal models of stroke and hypertension have been, and will likely remain, very useful in providing insights into pathogenesis and treatment options. The most powerful insights can be derived from studies that are carried out using multiple, complementary methods (Lerman et al., 2019). The experiments will be performed in four different combinations of ischemic stroke (2) and hypertension (2) models described above. Though both models answer questions in the same domain, they recapitulate a different stroke- and hypertension pathogenesis, therefore we assess them in separate studies, providing complimentary sources information that contribute towards achieving the primary objective.

Choice of MRI methods

The choice of in vivo MRI is justified by the following advantages:

- **In vivo MRI experiments are non-invasive or minimally invasive**, enabling repetitive and longitudinal study of the same subject, which allows us to use **fewer animals** while retaining statistical power.
- MRI is powerful and versatile: multimodal experiments can be set up in such a way that images convey information about anatomical or functional properties of the brain, which has been tremendously useful in the study of ischemic stroke (Mandeville et al., 2017).

- MRI is also used for stroke diagnosis and research in the clinic. Many signal mechanisms in human and animal models of stroke share the same physiological underpinnings and can be studied using (mostly) the same MRI methodology (Dijkhuizen and Nicolay, 2003; Mandeville et al., 2017). Therefore, by incorporating preclinical MRI in our experimental workflow, we increase the translational potential of our results.
- Relatedly, if our proposed MRI strategy turns out to be highly informative regarding AIS decision-making or outcome prediction, our experimental parameters can be quickly adopted on human MRI scanners; in other words, MRI accelerates the bench-to-bedside translation process.

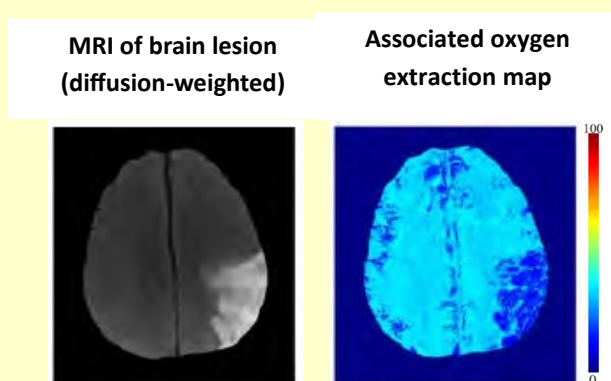


Figure 3: demonstration of oxygen metabolism imaging in the brain of an ischemic stroke patient with a lesion (hyperintense on diffusion weighted image; left) and oxygen extraction fraction (OEF) map obtained by QQ-MRI (right). Patient was imaged four days post-stroke (Cho et al. (2022))

As mentioned, MRI methods of [REDACTED] will enable us to answer our research questions and some go/no-go moments of the main studies. See Figure 3 below of the experimental oxygen extraction fraction technique called “QQ-MRI” that we plan to implement. This example shows an oxygen extraction fraction map (right-hand side) of a patient with a four-day-old stroke lesion. In this subacute phase of stroke, tissue that encompasses the lesion will be anything but alive, and therefore we see a dramatic drop in oxygen utilization. It is believed that early after treatment, oxygen utilization is a key indicator of tissue viability long before infarction sets in: metabolically stressed tissue will exhibit abnormal oxygen utilization, and functionally dead tissue will not extract oxygen, regardless of how it is perfused. Conversely, salvaged tissue should exhibit some degree of locally restored OEF. With spatio-temporal voxel analyses, we can directly relate the degree of (abnormal) oxygen

utilization to perfusion and lesion growth using correlation or multiple regression analyses in our animals models, which provides answers to our go/no-moments and research questions (RQ 2-5).

Individualized experiments and comorbidities

Our experiments (with the exception of the optimization studies) include both sexes. Furthermore, by investigating the effect of comorbidity (RQ 5 and 9), we aim at making an important step towards translating the results towards the clinical setting.

Timing of experiments

We have provided estimated timing of the experiments, but the timing may be adapted for logistic or other reasons. For example, the preclinical trial of [REDACTED] (appendix 2) involves a rather simple design and stroke model, this study may take place earlier or later in the lifetime of the project license.

We start with genetic model of hypertension combined with the intraluminal filament or embolic model of stroke, because both models of stroke have been established for many years in our lab and the genetic model of hypertension does not require implementation. There are currently many unknowns regarding the interaction between [REDACTED] [REDACTED] tissue function and lesion outcome after ischemia. By collecting data about these mechanisms first, we will have a firmer basis for any potential intervention.

Study outcomes

For the descriptive research questions (RQ 2-5), the main outcome parameters are quantitative data on the brain lesion at several time points after stroke onset using longitudinal MRI, supplemented by readouts on [REDACTED], brain [REDACTED] (example in [REDACTED] and post-mortem histological analysis. Mechanistic studies (RQ 6) will especially benefit from post-mortem molecular readouts. The effectiveness of possible treatment strategies (RQ 7-9) will be evaluated based on quantitative comparison of MRI-based lesion size and neurological outcome tests. These tests will focus on sensorimotor function, limiting testing time, with possible extension to cognitive tests for specific experiments in research questions 8-9, should there be concerns on drug effects on cognition.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Revealing determinants of futile recanalization with MRI in animal models of stroke
2	Testing the efficacy of [REDACTED] and [REDACTED] for neuroprotection in an animal model stroke
3	Locally breeding genetically hypertensive rats
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.

References

- Admiraal MM, Velseboer DC, Tjabbes H, Vis P, Peeters-Scholte C, Horn J (2023) Neuroprotection after cardiac arrest with 2-iminobiotin: a single center phase IIa study on safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Front Neurol.* 14:1136046. DOI: 10.3389/fneur.2023.1136046.
- Ahnstedt H, McCullough LD, Cipolla MJ (2016) The Importance of Considering Sex Differences in Translational Stroke Research. *Translational Stroke Research.* 7:261–273. DOI: 10.1007/s12975-016-0450-1.
- Albrecht M, Zitta K, Groenendaal F, van Bel F, Peeters-Scholte C (2019) Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS. *Free Radical Biology and Medicine.* 142:123–131. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.025.
- Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, Van Den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, et al. (2015) A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine.* 372:11–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1411587.
- Biondetti E, Cho J, Lee H (2023) Cerebral oxygen metabolism from MRI susceptibility. *NeuroImage.* 276:120189. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2023.120189.
- Boers AMM, Jansen IGH, Brown S, Lingsma HF, Beenen LFM, Devlin TG, Román LS, Heo J-H, et al. (2019) Mediation of the Relationship Between Endovascular Therapy and Functional Outcome by Follow-up Infarct Volume in Patients With Acute Ischemic Stroke. *JAMA Neurology.* 76:194–202. DOI: 10.1001/jamaneurol.2018.3661.
- Bouts MJ, Tiebosch IA, Rudrapatna US, van der Toorn A, Wu O, Dijkhuizen RM (2017) Prediction of hemorrhagic transformation after experimental ischemic stroke using MRI-based algorithms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 37:3065–3076. DOI: 10.1177/0271678X16683692.

- Casadevall A, Fang FC (2009) *Mechanistic Science*. *Infect Immun*. 77:3517–3519. DOI: 10.1128/IAI.00623-09.
- Cho J, Zhang J, Spincemaille P, Zhang H, Hubertus S, Wen Y, Jafari R, Zhang S, Nguyen TD, Dimov AV, Gupta A, Wang Y (2022) QQ-NET – using deep learning to solve quantitative susceptibility mapping and quantitative blood oxygen level dependent magnitude (QSM+qBOLD or QQ) based oxygen extraction fraction (OEF) mapping. *Magnetic Resonance in Medicine* 87:1583–1594.
- Cipolla MJ, Chan S-L (2020) Impact of Acute and Chronic Hypertension on Changes in Pial Collateral Tone In Vivo During Transient Ischemia. *Hypertension*. 76:1019–1026. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15356.
- Cipolla MJ, Liebeskind DS, Chan S-L (2018) The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 38:2129–2149. DOI: 10.1177/0271678X18800589.
- de Boer AR, van Dis I, Wimmers RH, Vaartjes I, Bots ML (2020) Hart- en vaatziekten in Nederland 2020.
- De Feyter HM, Behar KL, Corbin ZA, Fulbright RK, Brown PB, McIntyre S, Nixon TW, Rothman DL, et al. (2018) Deuterium metabolic imaging (DMI) for MRI-based 3D mapping of metabolism in vivo. *Science Advances*. 4:eaat7314. DOI: 10.1126/sciadv.aat7314.
- Deng G, Chu Y, Xiao J, Shang K, Zhou L-Q, Qin C, Tian D-S (2023) Risk Factors, Pathophysiologic Mechanisms, and Potential Treatment Strategies of Futile Recanalization after Endovascular Therapy in Acute Ischemic Stroke. *Aging Dis*. 14:2096–2112. DOI: 10.14336/AD.2023.0321-1.
- Deng G, Xiao J, Yu H, Chen M, Shang K, Qin C, Tian D-S (2022) Predictors of futile recanalization after endovascular treatment in acute ischemic stroke: a meta-analysis. *Journal of NeuroInterventional Surgery*. 14:881–885. DOI: 10.1136/neurintsurg-2021-017963.
- Dijkhuizen RM, Nicolay K (2003) Magnetic Resonance Imaging in Experimental Models of Brain Disorders. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23:1383–1402. DOI: 10.1097/01.WCB.0000100341.78607.EB.
- Doche E, Sulowski C, Guignon J-M, Graslin F, Casolla B, Hak J-F, Carle X, Brunel H, et al. (2024) How Clot Composition Influences Fibrinolysis in the Acute Phase of Stroke: A Proteomic Study of Cerebral Thrombi. *Stroke*. 55:1818–1829. DOI: 10.1161/STROKEAHA.124.047156.
- El Amki M, Wegener S (2017) Improving Cerebral Blood Flow after Arterial Recanalization: A Novel Therapeutic Strategy in Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. 18:2669. DOI: 10.3390/ijms18122669.
- Erdener ŞE, Tang J, Kılıç K, Postnov D, Giblin JT, Kura S, Chen I chun A, Vayisoğlu T, et al. (2020) Dynamic capillary stalls in reperfused ischemic penumbra contribute to injury: A hyperacute role for neutrophils in persistent traffic jams. *J Cereb Blood Flow Metab*. 41:236–252. DOI: 10.1177/0271678X20914179.
- Fan J, Li X, Yu X, Liu Z, Jiang Y, Fang Y, Zong M, Suo C, et al. (2023) Global Burden, Risk Factor Analysis, and Prediction Study of Ischemic Stroke, 1990–2030. *Neurology*. 101:e137–e150. DOI: 10.1212/WNL.0000000000207387.
- Feigin VL, Stark BA, Johnson CO, Roth GA, Bisignano C, Abady GG, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, et al. (2021) Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Neurology*. 20:795–820. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0.
- Franx BAA, Tiebosch IA, Toorn A van der, Dijkhuizen RM (2024a) Chronic hypertension and perfusion deficits conjointly affect disease outcome after tPA treatment in a rodent model of thromboembolic stroke. :2024.03.20.585876. DOI: 10.1101/2024.03.20.585876.

- Franx BAA, Van der Toorn A, Van Heijningen C, Vivien D, Bonnard T, Dijkhuizen RM (2021) Molecular Magnetic Resonance Imaging of Vascular Inflammation After Recanalization in a Rat Ischemic Stroke Model. *Stroke*. 52:e788–e791. DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.034910.
- Franx BAA, van Tilborg GAF, Taha A, Bobi J, van der Toorn A, Van Heijningen CL, van Beusekom HM, Wu O, et al. (2024b) Hyperperfusion profiles after recanalization differentially associate with outcomes in a rat ischemic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 44:209–223. DOI: 10.1177/0271678X231208993.
- Franx BAA, van Tilborg GAF, van der Toorn A, van Heijningen CL, Dippel DWJ, van der Schaaf IC, Dijkhuizen RM, on behalf of the CONTRAST consortium (2024c) Propofol anesthesia improves stroke outcomes over isoflurane anesthesia—a longitudinal multiparametric MRI study in a rodent model of transient middle cerebral artery occlusion. *Frontiers in Neurology*. 15 DOI: 10.3389/fneur.2024.1332791.
- Gomez CR (1993) Time is brain! *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 3:1–2.
- Goyal M, Menon BK, Zwam WH van, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, Dávalos A, Majoie CBLM, et al. (2016) Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet*. 387:1723–1731. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
- He C, Song X, Zhu Z, Xiao Y, Chen J, Yao H, Xie R (2024) Ghrelin may protect against vascular endothelial injury in Acute traumatic coagulopathy by mediating the RhoA/ROCK/MLC2 pathway. *J Thromb Thrombolysis*. DOI: 10.1007/s11239-024-03029-3.
- Hoffmann U, Sheng H, Ayata C, Warner DS (2016) Anesthesia in Experimental Stroke Research. *Translational Stroke Research*. 7:358–367. DOI: 10.1007/s12975-016-0491-5.
- Hussein HM, Saleem MA, Qureshi AI (2018) Rates and predictors of futile recanalization in patients undergoing endovascular treatment in a multicenter clinical trial. *Neuroradiology*. 60:557–563. DOI: 10.1007/s00234-018-2016-2.
- Jiao Q, Du X, Li Y, Gong B, Shi L, Tang T, Jiang H (2017) The neurological effects of ghrelin in brain diseases: Beyond metabolic functions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 73:98–111. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.12.010.
- Jolugbo P, Ariëns RAS (2021) Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 52:1131–1142. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.032810.
- Katare R, Rawal S, Munasinghe PE, Tsuchimochi H, Inagaki T, Fujii Y, Dixit P, Umetani K, et al. (2016) Ghrelin Promotes Functional Angiogenesis in a Mouse Model of Critical Limb Ischemia Through Activation of Proangiogenic MicroRNAs. *Endocrinology*. 157:432–445. DOI: 10.1210/en.2015-1799.
- Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, et al. (2019) Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 73:e87–e120. DOI: 10.1161/HYP.0000000000000090.
- Mandeville ET, Ayata C, Zheng Y, Mandeville JB (2017) Translational MR Neuroimaging of Stroke and Recovery. *Transl Stroke Res*. 8:22–32. DOI: 10.1007/s12975-016-0497-z.
- Melikian N, Seddon MD, Casadei B, Chowienczyk PJ, Shah AM (2009) Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc Med*. 19:256–262. DOI: 10.1016/j.tcm.2010.02.007.
- Mohaddes G, Abdolalizadeh J, Babri S, Hossienzadeh F (2017) Ghrelin ameliorates blood-brain barrier disruption during systemic hypoxia. *Exp Physiol*. 102:376–382. DOI: 10.1113/EP086068.

- Neumann-Haefelin T, Kastrup A, de Crespigny A, Yenari MA, Ringer T, Sun GH, Moseley ME (2000) Serial MRI After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke*. 31:1965–1973. DOI: 10.1161/01.str.31.8.1965.
- Nijboer CHA, Groenendaal F, Kavelaars A, Hagberg HH, van Bel F, Heijnen CJ (2007) Gender-specific neuroprotection by 2-iminobiotin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat via a nitric oxide independent pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*. 27:282–292. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600342.
- Pires PW, Dams Ramos CM, Matin N, Dorrance AM (2013) The effects of hypertension on the cerebral circulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 304:H1598–H1614. DOI: 10.1152/ajpheart.00490.2012.
- Rha J-H, Saver JL (2007) The Impact of Recanalization on Ischemic Stroke Outcome. *Stroke*. 38:967–973. DOI: 10.1161/01.STR.0000258112.14918.24.
- Roy R, Wilcox J, Webb AJ, O’Gallagher K (2023) Dysfunctional and Dysregulated Nitric Oxide Synthases in Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci*. 24:15200. DOI: 10.3390/ijms242015200.
- Schröder J, Thomalla G (2017) A Critical Review of Alberta Stroke Program Early CT Score for Evaluation of Acute Stroke Imaging. *Frontiers in Neurology*. 7 DOI: 10.3389/fneur.2016.00245.
- Shrouder JJ, Calandra GM, Filser S, Varga DP, Besson-Girard S, Mamrak U, Dorok M, Bulut-Impraim B, et al. (2023) Continued dysfunction of capillary pericytes promotes no-reflow after experimental stroke in vivo. *Brain*. DOI: 10.1093/brain/awad401.
- Siero JCW, Bhogal A, Jansma JM (2013) Blood Oxygenation Level-dependent/Functional Magnetic Resonance Imaging: Underpinnings, Practice, and Perspectives. *PET Clinics*. 8:329–344. DOI: 10.1016/j.cpet.2013.04.003.
- Spellicy SE, Hess DC (2022) Recycled Translation: Repurposing Drugs for Stroke. *Transl Stroke Res*. 13:866–880. DOI: 10.1007/s12975-022-01000-z.
- Spencer SJ, Miller AA, Andrews ZB (2013) The Role of Ghrelin in Neuroprotection after Ischemic Brain Injury. *Brain Sciences*. 3:344–359. DOI: 10.3390/brainsci3010344.
- Straathof M, Meerwaldt AE, De Feyter HM, de Graaf RA, Dijkhuizen RM (2021) Deuterium Metabolic Imaging of the Healthy and Diseased Brain. *Neuroscience*. 474:94–99. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.01.023.
- van der Knaap N, Franx BAA, Majoie CBLM, van der Lugt A, Dijkhuizen RM, on behalf of the CONTRAST consortium (2024) Implications of Post-recanalization Perfusion Deficit After Acute Ischemic Stroke: a Scoping Review of Clinical and Preclinical Imaging Studies. *Transl Stroke Res*. 15:179–194. DOI: 10.1007/s12975-022-01120-6.
- van der Steen W, Graaf RA van de, Chalos V, Lingsma HF, Doormaal PJ van, Coutinho JM, Emmer BJ, Ridder I de, et al. (2022) Safety and efficacy of aspirin, unfractionated heparin, both, or neither during endovascular stroke treatment (MR CLEAN-MED): an open-label, multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*. 399:1059–1069. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00014-9.
- van der Wijk A-E, Lachkar N, de Vos J, Grootemaat AE, van der Wel NN, Hordijk PL, Bakker ENTP, vanBavel E (2019) Extravasation of Microspheres in a Rat Model of Silent Brain Infarcts. *Stroke*. 50:1590–1594. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.024975.
- van Meer MPA, Otte WM, Marel K van der, Nijboer CH, Kavelaars A, Sprenkel JWB van der, Viergever MA, Dijkhuizen RM (2012) Extent of Bilateral Neuronal Network Reorganization and Functional Recovery in Relation to Stroke Severity. *J Neurosci*. 32:4495–4507. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3662-11.2012.

- Walker M, Federico E, Espinoza JL, Dupont CL (2024) Unveiling Molecular Diversity in Cerebral Thrombi via Spatial Transcriptomics. *Stroke*. 55:e266–e268. DOI: 10.1161/STROKEAHA.124.047907.
- Zitta K, Peeters-Scholte C, Sommer L, Parczany K, Steinfath M, Albrecht M (2016) Insights into the neuroprotective mechanisms of 2-iminobiotin employing an in-vitro model of hypoxic-ischemic cell injury. *European Journal of Pharmacology*. 792:63–69. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.10.026.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD11500202418345
2. Titel van het project : The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke:
CONTRAST 2.0
3. Titel van de NTS : Op zoek naar oorzaken van behandelfalen na een herseninfarct
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer :
5. Contactgegevens DEC
 - Naam DEC : DEC Utrecht
 - Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
 - Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 05-09-2024
 - aanvraag compleet:
 - in vergadering besproken: 04-09-2024 en 06-11-2024
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van / tot: 10-09-2024 / 18-10-2024 en 07-10-2024 / 20-11-2024
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met 15 werkdagen: 10-09-2024
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 02-12-2024
7. De aanvraag is afgestemd met de lvD en deze is hiermee akkoord.
8. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: 04-09-2024
 - Plaats: Utrecht
 - Aantal aanwezige DEC-leden: 5
 - Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
 - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de strategie, de financiële haalbaarheid, het ongerief, het consortium en de te fokken dieren. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9a, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- 9a. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum brief CCD met vragen: 10-09-2024

- Datum antwoord: 18-10-2024
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

Het project is vanuit de techniek beschreven en minder vanuit de academische invalshoek. De aanvraag dient een coherent wetenschappelijk voorstel te zijn. Kunt u de achtergrond en uw eenduidige hypothese(s), keuzes in modellen, go-no go's en onderbouwing van de aantallen dieren duidelijk vermelden?

Om een reactie te geven op deze vraag delen wij onze respons op in de verschillende onderdelen die in deze vraag verwerkt zitten.

Achtergrond:

Deze aanvraag is voornamelijk geschreven met de resultaten van CONTRAST 1.0 als uitgangspunt, en wellicht is een deel van de achtergrond impliciet verwerkt door te refereren naar artikelen die uit CONTRAST 1.0 voortgekomen zijn. Hopelijk kunt u begrijpen dat het voor de aanvrager enigszins gissen is, welke (en hoeveel) achtergrond er precies door de commissie vereist wordt. De volgende zaken zijn toegevoegd:

- *Tijdens de DEC vergadering is er kort gesproken over de fysiologische oorsprong van het effect van hypertensie op de uitkomst na een beroertebehandeling. Hoewel er al een naar aanzienlijke hoeveelheid literatuur over dit onderwerp verwezen werd, is deze informatie nu verder in woorden uitgewerkt in de achtergrond (p. 4).*
- *Ook is het nut en de noodzaak van de keuze voor MRI in het experimentele design verduidelijkt (omdat hiermee effecten van hypertensie op vaatfunctie longitudinaal kunnen worden gemeten). Dit moet de noodzaak en bijdrage van de meettechniek aan nieuwe informatie onderstrepen (p. 5, p. 15).*

Eenduidige hypothesen:

We erkennen dat de hypothesen beter uitgespeld hadden moeten worden. Deze staan nu vermeld, per hoofddoel, onder 3.2.1 (p. 6).

Keuzes in modellen:

We hebben keuzemogelijkheden voor modellen verduidelijkt onder 3.4.1, en extra uitleg voor deze keuzes toegevoegd onder 3.4.2. Ook is de tekst in appendix 1 rondom deze modellen aangescherpt. Dit geldt vooral voor de hypertensiemodellen, de keuzes voor stroke modellen liggen nagenoeg vast.

Go/no-go:

Wij zijn van mening dat deze go/no-go criteria, waarvan sommige direct uit CONTRAST 1.0 zijn overgenomen, logische en toetsbare vangrails zijn voor de uitvoer van de studies die we beschreven hebben.

Ter verduidelijking, er staan grofweg twee typen go/no-go's in deze aanvraag en deze gelden voornamelijk voor appendix 1: het zijn criteria geldend voor pilots en de hoofdstudies.

- *Go/no-go's voor pilot studies zijn algemeen van aard en moeten ervoor waken dat de methodiek adequaat is en dat aan de randvoorwaarden van succesvolle chirurgie wordt voldaan. Dit zijn simpele criteria zoals de maximaal toelaatbare tijd waarin een stroke inductie voltooid moet worden, en deze zijn vrijwel direct overgenomen uit het eerdere CONTRAST 1.0 project. We hebben deze criteria verduidelijkt door drempelwaarden toe te*

voegen (e.g., 45 minuten voor een stroke operatie).

- De go/no-go momenten voor de hoofdstudies zijn **direct** vertaald uit de hypothesen: we kunnen toetsen of aan deze voorwaarden wordt voldaan met een statistische test. Een voorbeeld van dergelijke test is significante correlatie tussen lesiegroei na een infarctbehandeling, en het volume van ██████████. In andere woorden, voorwaarden voor deze go/no-go momenten zijn **kwantificeerbaar en toetsbaar**. In een poging dit inzichtelijk te maken hebben we Figuur 3 toegevoegd (pagina 15) als voorbeeld van een MRI-analyse. Om het gewicht van de criteria duidelijker te maken hebben we verwachte effect sizes toegevoegd.

Onderbouwing aantal dieren:

We hebben het aantal dieren naar beneden bijgesteld door het aantal post-mortem experimenten in te perken; het is achteraf gezien niet realistisch om er van uit te gaan dat alle post-mortem groepen benut gaan worden (en dus gedefinieerd moeten worden). In plaats daarvan hebben we nu mogelijke post-mortem groepen aangegeven in onze experimenten, maar we kiezen een maximaal aantal groepen (tijdstippen) die we gaan inzetten – zie appendices 1 en 2 voor de precieze aantallen. Hierdoor liggen de verzochte aantallen nog dicht bij de aantallen die we gaan gebruiken.

De gevraagde aantallen voor de hoofdstudies waren reeds onderbouwd met a priori power analyses en zijn onveranderd. Als u het niet eens bent met de onderbouwing stellen we voor opnieuw in gesprek te gaan.

Uw project maakt onderdeel uit van een groot consortium waarbij meerdere academische ziekenhuizen betrokken zijn. U richt zich in deze aanvraag uiteraard op uw onderzoek en expertise (MRI en imaging). Kunt u voor de volledigheid een korte context schetsen over het consortium waar uw project t.a.v. mechanismen in de vaten uit voortvloeit? Kunt u daarbij ook de keuze van het consortium voor onderzoek naar ██████████ en ██████████ toelichten?

██████████ en ██████████ grijpen aan op vaatfunctie en zijn daarom relevant voor het consortium en het kader dat we schetsen in deze aanvraag. Met deze experimenten storten we ons met name op onderzoeksvragen die niet beantwoord kunnen worden in de klinische trials, zoals hypothesen over de "mode-of-action" van deze middelen.

Meer informatie is terug te vinden in de tekst die we hebben toegevoegd over de bijdrage van ██████████ en ██████████ (pagina 3 en 4). Daarna vervolgen we op pagina 12.

Overgebleven materiaal uit dit onderzoek wilt u aan andere samenwerkende onderzoekers aanbieden voor ex vivo experimenten in het consortium. De DEC is voorstander van samenwerking. De DEC vraagt zich echter af of er dan voldoende materiaal voor de andere onderzoekers beschikbaar is in de keten en is het haalbaar? Dit kan namelijk van invloed zijn op het aantal benodigde dieren.

Het dierlijk materiaal dat we verzamelen wordt eerst gebruikt om onze eigen wetenschappelijke doelen te halen. Wat wij bedoelen met de passages over het aanbieden van dierlijk materiaal aan de CONTRAST biobank (zoals te zien in Figuur 1) is:

- We willen dierlijk materiaal niet zomaar weggooiden. Dat willen we graag opslaan in de biobank, zodat geïnteresseerde partijen het kunnen gebruiken
- Andere onderzoekers uit het consortium kunnen in de toekomst bij ons aankloppen voor

dierlijk onderzoeksmateriaal (voor pilots of volwaardige studies, mits we dat overhouden), maar deze aanvragen zijn ondergeschikt aan onze eigen doelen en hebben wellicht ook niets met onze beschreven doelstellingen te maken. Het aanbieden van overgebleven materiaal gebeurt na afloop van het project en heeft geen invloed op de haalbaarheid van onze doelen.

De in ontwikkeling zijnde stof [REDACTED] is eigendom van een startup en de werking ervan wordt al in klinisch onderzoek onderzocht. Kunt u de keuze voor deze stof onderbouwen en duidelijk aangeven wat de mogelijke betrokkenheid en de belangen van het bedrijf in dit project zijn?

Afspraken tussen het bedrijf en het CONTRAST consortium over gebruik en levering van [REDACTED] intellectueel eigendom, etc moeten nog gemaakt worden voor deze preklinische studie, deze zaken zullen worden vastgelegd in een agreement. Als dit is overeengekomen, zal 2-IB (in de vorm van [REDACTED] Drug Product + indien gewenst corresponderende placebo) door het bedrijf ter beschikking gesteld worden voor deze preklinische studie. [REDACTED] is reeds getest in een fase 2a studie op veiligheid, tolerabiliteit en PK in volwassenen na large-vessel stroke met reperfusie [REDACTED]

[REDACTED] Hierbij bleek [REDACTED] veilig en goed te worden verdragen. Er zijn echter nog onopgeloste vragen, zoals of toediening na stroke inductie of na reperfusie het beste werkt, of er een interactie is met thrombolysen en of er een man/vrouw verschil te zien is. We hopen daarnaast met deze preklinische testen een aantal mechanismen verder te ontrafelen: 1) het mogelijk afremmen van omzetting tissue-at-risk naar core, en 2) secundaire effecten/reperfusie schade verminderen. Kunt u duidelijk vermelden waarom dit onderzoek niet in humane beroerte-patiënten mogelijk is?

Dit stond reeds vermeld in de NTS (32) maar hebben het nu nog explicieter en uitgebreider behandeld op pagina 13 van het hoofddocument.

U heeft aangegeven dat het ongerief in de praktijk, voor een groot deel van de dieren, minder dan 'ernstig ongerief' zal zijn. Kunt u, op basis van uw ervaring uit het vorige onderzoek en uw contacten met andere onderzoekers een nauwkeuriger inschatting maken van de mate van ongerief?

Op basis van de ervaring met dieren in CONTRAST 1.0 schat ik in dat 20% van de succesvolle operaties een lesie produceert die zal leiden tot ernstig ongerief. De inschatting van de totale verdeling van ongeriefsclassificaties zijn hierop aangepast.

Het moment tussen het opwekken van de beroerte en de behandeling (de timing) is essentieel en nu ruim gesteld tussen de 30-180 minuten. Kunt u aangeven op welke tijdstippen u experimenten uitvoert? Kunt u tevens onderbouwen wat het klinisch relevante window is?

We zijn het niet eens met de stelling dat dit een ruime definitie is: het zijn gangbare occlusietijden, gebaseerd op de literatuur onze eigen ervaring.

In deze projectaanvraag kiezen we, net als in CONTRAST 1.0, voor een range van 30 – 180 minuten. Dat zit zo: 45-60 minuten leidt meestal tot een kleinere lesie met mildere hersenschade, 90 minuten leidt tot een variabele lesie ("dubbeltje op zijn kant", soms is reperfusie effectief, soms niet), en langer dan 120 minuten leidt vaak tot een maximale lesie met weinig herstel. Wij vinden dat een occlusietijd langer dan 180 minuten niet meer klinisch relevant is, mede omdat patiënten met symptomen die ouder zijn dan een bepaalde tijd (afhankelijk van land waarin men zich

bevindt) überhaupt niet meer behandeld mogen worden doordat klinisch resultaat uitblijft of de kans op complicaties groeit.

We begrijpen dat het niet mogelijk is om een hele reeks oclusietijden te gaan testen, daarom beperken we ons tot een keuze van maximaal drie oclusietijden voordat we de studie beginnen. De reden dat we ons nu echter nog niet vastpinnen op een bepaalde oclusietijd, is een mogelijke situatie waarin een toekomstig paper verschijnt met een bepaald resultaat waarbij men bv 75 minuten geocludeerd heeft. Als we in deze aanvraag stellen dat we alleen 90 minuten occluderen, dan kan kunnen we dit experiment niet reproduceren.

Wellicht ten overvloede, maar we willen het volgende graag onderstrepen: we verwachten dat de duur van de occlusie verband zal houden met het vermogen van het brein om te herstellen (appendix 1, pagina 2), en dit kunnen we naar verwachting (gebaseerd op CONTRAST 1) verklaren met MRI-data over lesiegroei, [REDACTED] en [REDACTED] (zie onze hypotheses).

Om het belang van oclusietijd te toetsen (naast andere belangrijke factoren zoals vasculaire comorbiditeit), is belangrijk om verschillende oclusietijden te gebruiken.

Veel van de bovenstaande informatie was reeds aanwezig in appendix 1 op pagina 8 (grotendeels overgenomen uit de projectaanvraag van CONTRAST 1.0). De tekst is nu wat aangescherpt met extra informatie uit deze reactie. Ook is een deel van deze informatie ter verduidelijking toegevoegd aan het hoofddocument onder 3.4, omdat het onderdeel uitmaakt van onze strategie om futiele recanalizatie aan te tonen en te bestrijden (pagina 10).

Het gaat om fok met ongerief. Kunt u beargumenteren welke lijn(en) u wilt u gebruiken, ook al is de fok er nu nog niet?

Akkoord. We zullen ons in deze aanvraag beperken tot de Spontaneous Hypertensive Rat (SHR) en de Dahl Salt-Sensitive rat (DSS). Hiervoor zijn de nodige aanpassingen gemaakt in appendix 3.

Niet Technische Samenvatting

De tekst lijkt een vertaling uit het Engels te zijn waardoor sommige zinnen niet helemaal kloppen, b.v. bij punt 34 'dood blijkt de lopen'. Wilt u dit nagaan?

De tekst is niet vertaald uit het Engels, maar wellicht is hier en daar een anglicisme erin geslopen. Ik ben opnieuw door de tekst gegaan op zoek naar dit soort stijlfouten en naar eigen inzicht verbeteringen aangebracht.

De NTS is bedoeld voor algemeen publiek waardoor moeilijke termen vermeden dienen te worden. Wilt u moeilijke termen vervangen zoals bijvoorbeeld in de titel het woord 'ischemische' beroerte? En in veld 23 is de term 'modellen' gebruikt op een manier die niet voor elke leek duidelijk zal zijn.

"Ischemische beroerte" is vervangen door "herseninfectie". In veld 23 is "modellen" vervangen door "naboetsen".

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9b. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 06-11-2024
- Datum antwoord: 20-11-2024
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

3.2 Doel: De DEC heeft de indruk dat dit project (mede) gefinancierd wordt vanuit de 3^e geldstroom en dat het onderzoek onder voorbehoud van financiering uitgevoerd kan worden. Klopt dit, en kunt u aangeven welke onderdelen in ieder geval uitgevoerd kunnen worden / haalbaar zijn in dit project en welke onderdelen afhankelijk zijn van nog te realiseren financiering?

Het klopt dat dit project wordt gefinancierd vanuit de 3^e geldstroom (o.a. Hartstichting). Er zijn vier onderdelen (doelen) gespecificeerd in het programma van het consortium, twee daarvan kunnen in ieder geval worden uitgevoerd; dit zijn doel 1 en 2 in box 3.2.

Voor doel 3 en 4 (ook gespecificeerd in box 3.2) zijn we afhankelijk van nog te realiseren financiering. In Figuur 1 kunt u eveneens zien dat CONTRAST 2.0 vier doelen heeft, daarvan zijn de laatste twee in grijze opdruk weergegeven, wat betekent dat we nog op geld wachten voordat we naar deze doelen toe kunnen gaan werken (legenda Figuur 1).

De acquisitie is momenteel dus nog gaande. We willen wel beginnen met de doelen waar nu geld voor beschikbaar is (doel 1 & 2). Daarom kiezen we ervoor om nu alleen een vergunning aan te vragen voor deze doelen, de overige doelen worden via een amendement aangevraagd zodra dat mogelijk is (box 3.2).

3.4 Strategie: Er is nog onduidelijkheid over de keuze en inzet van hypertensiemodellen. Er zijn twee mogelijke primaire hypertensiemodellen (de SHR- en de DSS-rat) en twee mogelijke secundaire hypertensiemodellen (renovascular clipping en angiotensin-II infusie). Het lijkt er op dat u één model voor primaire en één model voor secundaire hypertensie wil bestuderen in combinatie met twee stroke modellen (2x2). Indien dit correct is, kunt u dan toelichten op basis waarvan u het te bestuderen model voor primaire en voor secundaire hypertensie kiest?

Wat de literatuur over hypertensie duidelijk maakt is dat er meerdere modellen bestaan voor primaire en secundaire hypertensie, maar deze modellen vertegenwoordigen bepaalde kenmerken van deze typen op hun eigen manier, en daardoor zijn sommige modellen representatiever voor bepaalde patiënten dan andere. Dit staat uitgelegd in box 3.4, en voor meer informatie verwijzen we naar Appendix 1. Hier staat, op pagina 5, dat we voor secundaire hypertensie een model kunnen gebruiken dat bloeddorstroom naar de nieren vermindert, of een model waar chronisch angiotensine-II wordt geïnfuseerd. Hier staat ook dat beide modellen verschillende maar veelvoorkomende kenmerken van hypertensie nabootsen. Het is mogelijk dat één van deze modellen relevanter is om te combineren met een stroke model om futiele rekanalisatie te onderzoeken, maar welk model dat is weten we nog niet zeker. Omdat beide modellen naar verwachting evenveel ongerief opleveren voor het dier (zie appendix 1, pagina 5) specificeren we ze allebei, maar we zullen voor het werkprotocol een keuze gemaakt hebben na goed overleg met experts. Voor het model van primaire hypertensie gaat dezelfde redenering op; wij zien zowel de genetische aanleg als de dieet-geïnduceerde variant van hypertensie als een relevante risicofactor voor futiele rekanalisatie. Omdat beide modellen relevant zullen zijn, en de ene niet meer ongerief oplevert dan de andere, kiezen we het liefst een model in samenspraak met een expert.

U vermeldt in de tekst t.a.v. een nieuw rat-model op blz. 14 we will not apply such a model if there are indications that discomfort will be higher than "severe".

Hoger dan ernstig ongerief is zeer ernstig ongerief. Bedoelt u dit ook? Impliceert deze opmerking dat u ernstig ongerief wel acceptabel zou vinden bij dit model? Dat zou voor de DEC niet wenselijk zijn.

De herseninfarctmodellen die gespecificeerd zijn in deze aanvraag kunnen niet meer dan ernstig ongerief toebrengen aan het dier (dus niet zéér ernstig ongerief). Als er ernstig ongerief plaatsvindt is dit tijdelijk, tot ongeveer enkele dagen na inductie van het model; dit kan matig of ernstig zijn (zoals uitgelegd in o.a. Appendix 1, pagina 7), dit wordt als acceptabel beschouwd en we wijken niet af van welzijnsaantasting die eerder is goedgekeurd voor CONTRAST 1.0.

Met de opmerking in de huidige aanvraag wordt bedoeld dat we geen nieuw model willen toepassen dat ernstiger is dan de modellen die al gespecificeerd zijn. Bijvoorbeeld: als er een model wordt ontwikkeld dat nuttig is voor onze studies, maar dat in 100% van de dieren ernstig ongerief veroorzaakt, of in een enkel dier zeer ernstig ongerief, dan gaan we dat model niet toepassen. Uiteraard gaat het toepassen van een model alleen na toestemming van de IvD.

Bijlage 1

A. De dieren

Kunt u een navolgbare onderbouwing van de aantallen dieren in alle bijlagen geven? Enkele voorbeelden:

In bijlage 1: Voor de training van twee mensen worden 100 ratten aangevraagd en voor het testen van een MRI-protocol 50 ratten. Dit vindt de DEC, mede gezien uw ruime ervaring met MRI, veel dieren. Mogelijk is dit voor zowel het trainen als voor het instellen van het MRI-apparaat. Wilt u de aantallen onderbouwen?

Wij hebben ruime ervaring met MRI, maar hierdoor weten we ook dat een nieuw experiment ontwikkelen op een scanner een aanzienlijke pilotstudie op zichzelf vereist. Er zijn veel experimentele parameters die zorgvuldig afgesteld moeten worden. Zo zijn er verschillende pulssequenties die we moeten testen, bepaalde hoeveelheden contrastvloeistof moeten afgesteld worden, en mogelijk moeten er verschillende verhoudingen gas (niet de anesthesie zelf maar "carrier gas") afgesteld worden ten behoeve van de vasculaire reactiviteitsmetingen (zie pagina 9 van het hoofddocument). Een schatting van 50 dieren voor Pilot 1a vinden we daarom niet buitensporig veel.

We zijn het eens met de suggestie om dezelfde dieren te gebruiken voor Pilot 1a en Pilot 1b/1c.

We hebben daarom het volgende toegevoegd aan Appendix 1, pagina 10:

"For MRI protocol development, sacrifice is not the experimental endpoint and scanning only induced mild-to-moderate stress. Animals that have been used for this pilot will therefore be reused in non-recovery experiments for pilot 1b or 1c, which contributes to reduction."

En Appendix 1, pagina 11:

"Because MRI protocol development and testing can be done repetitively and non-destructively, we can use animals for pilots 1b and 1c as well, so these animals will not count towards the grand total of animals requested for this appendix."

In bijlage 1: In tabel 2 vermeldt u 608 dieren. De DEC vermoedt dat dit aantal - na de herziening van het project - 304 moet zijn. Wilt u de juiste aantallen vermelden?

In tabel 2 zien wij geen vermelding van 608 dieren; we vermoeden dat de DEC de tabel in box B bedoelt. Het aantal 608 klopt inderdaad niet, deze tabel moest nog een update krijgen na de herziening. Het correcte aantal is echter niet 304, maar 443.

Dit getal is af te leiden uit Tabel 2. Het totale aantal dieren dat we aanvragen voor de hoofdstudies van Appendix 1 is 886. Hiervan is de helft genetisch gemanipuleerd en de andere helft niet: $886/2 = 443$.

In bijlage 1: De berekening t.a.v. het aantal dieren m.b.t. de 25% uitval klopt niet. Wilt u dit aanpassen?

De berekening klopte inderdaad niet, omdat de vermeldde percentages in de tabel niet klopten. De uitval van het filament model en embolisch model zijn respectievelijk 20% en ~25% (niet 25% en 30% zoals eerder vermeldt. Excuses voor de verwarring.

In bijlage 2: Er zijn 100 ratten nodig voor kinetiek. Ook dit aantal is niet onderbouwd. Wat is het experimentele design?

Het aantal is gebaseerd op eigen ervaring (met name over uitval). We gebruiken een soortgelijk design zoals beschreven in de hoofdstudie van Appendix 2 (repeated measures ANOVA). We induceren een infarct met het filament model en meten de lesie tijdens én na de occlusie met MRI. Door de veranderingen in het volume van de lesie te meten kunnen we inschatten welke dosering het beste gebruikt kan worden in het hoofdexperiment. Met 100 dieren – hierbij zit uitval inbegrepen – hebben we voor ██████ en ██████ de ruimte om met voldoende zekerheid 3 doseringen te testen voor zowel ██████ als ██████. De exacte doseringen worden ingegeven door onze collega's uit CONTRAST 2.0. We hebben het volgende toegevoegd aan appendix 2, pagina 6: "We will use a similar design as described for the main study: brain infarcts are induced using the filament model and the lesion will be measured repetitively, during and after the occlusion. To this end we need 100 rats (50 rats per treatment arm), this number includes attrition estimates and is based on our experience. Using this repeated measures design, we can assess the dose-response for 3 dosages with acceptable certainty. The exact dosages will be decided with colleagues involved in the CONTRAST 2.0 clinical trials."

Wilt u de aantallen in de NTS overeen laten komen met de aantallen in de aanvraag?

De aantallen zijn aangepast na nieuwe bijwerkingen.

Kunt u aangeven waarom 80+40 ratten extra nodig zijn voor de postmortem studie en u geen gebruik kunt maken van de reguliere dieren die al in de verschillende groepen ingezet zijn? *Zoals reeds vermeld in Appendix 1 (pagina 9) en Appendix 2 (pagina 5), hebben we extra dieren nodig om secundaire maar relevante vraagstellingen te beantwoorden op bepaalde tijdstippen die vóór het eind van de studie liggen (dus tijdens baseline, tijdens occlusie (ischemie), of zeer vroeg na rekanalisatie). Het kan in dit onderzoek van belang zijn een MRI-meting vóór het eind van het hoofdexperiment te kunnen ondersteunen/valideren met een ex vivo analysetechniek. Dit kan iets essentieels zijn, zoals het correleren van zuurstofgebruik in het brein tijdens een infarct, gemeten met MRI, aan de toename van een bepaald eiwit in het brein gemeten met massa spectrometrie. Voor extra verduidelijking hebben het volgende toegevoegd aan het hoofddocument (pagina 9): In addition, we incorporate a limited amount of small experimental groups that will be sacrificed before the endpoint of the experiment, during critical events in the ischemic cascade (e.g., during ischemia or after recanalization). These so-called "post-mortem" groups will be used for ex vivo*

tissue analysis, which will yield readouts of important tissue parameters that will be used to correlate/validate our imaging findings. These post-mortem are necessary to answer secondary hypotheses regarding imaging findings and the progression of ischemic stroke.

Dieren die worden geofferd om een secundaire hypothese over hersenweefsel te beantwoorden halen we niet uit de hoofdstudie waar de poweranalyse voor gedaan is, omdat deze dieren het eind van de studie moeten halen (anders verliezen we power). Uiteraard gaan we geen extra dieren inzetten om MRI-uitlesparameters te correleren aan weefselparameters op het moment dat het experiment voorbij is (bijv op twee weken na het infarct zoals aangegeven in Tabel 1).

Het lijkt er op dat de dieren voor postmortem studies nu niet in de totalen zijn opgenomen. Als deze dieren extra nodig zijn, dan zouden ze ook in de tabellen (en in de totalen) moeten worden opgenomen.

De post-mortem dieren zijn wel in de totalen opgenomen. Voor de volledigheid zijn ze nu ook weergegeven in Tabel 2 (zie gele markering). Na de huidige bijwerking, de aftrek van 50 dieren voor pilot 1a (zie vierde vraag), ligt het totaal nu op 1086.

B. Pijn en welzijnsaantasting: Voor een gedragstest zijn vastenperiodes van 12 uur nodig. Is het vasten overdag of 's nachts? Dit i.v.m. de belasting/ongerief voor de dieren. Ziet u mogelijkheden om het dier te trainen met "voor hen lekker eten" i.p.v. te laten vasten? Dit zou verfijning kunnen zijn volgens de DEC.

De NDS en enkele sensomotorische tests zijn eenvoudig uit te voeren en vereisen geen training. Voor gedragstesten waar wel een vastenperiode nodig is (e.g., skilled reaching), is het niet de regel dat de dieren 12 uur geen eten krijgen. Bijvoorbeeld: uit onze ervaring met de skilled reaching task blijkt: dieren 12 uur van tevoren op "rantsoen" zetten – dieren krijgen 's nachts een afgewogen hoeveelheid voer in plaats van ad libitum – in combinatie met "voor hen lekker eten" tijdens de trials – dit zijn sucrosepellets met bananensmaak – levert de beste resultaten op. Het gebruik van exclusief sucrosepellets leverde, in onze ervaring, slechte trials op in de skilled reaching task, en deze data kon uiteindelijk niet gebruikt worden. Dieren die 12 uur van tevoren vrijuit mochten eten leken niet geïnteresseerd in de beloning. Wij zijn daarom van mening dat de beste verfijning ligt in een combinatie van rantsoen en een sucrosepellet-beloning tijdens de gedragstaak.

F. Classificatie van ongerief: Verspreid over twee weken vinden onder anesthesie maximaal 6 MRI-sessies plaats (met contrastvloeistof) en worden de dieren daarnaast nog tweemaal onder anesthesie gebracht. De DEC ziet de contrastvloeistof en de herhaalde anesthesie met recovery, ondanks de hersteltijd (1 werkdag?), als een zware belasting voor de dieren. De DEC vraagt zich af of het cumulatief ongerief dat hierdoor wordt veroorzaakt nog als matig ongerief kan worden geclassificeerd. Kunt u uw inschatting in iedere betreffende bijlage onderbouwen?

Wij zijn het met de DEC eens, met betrekking tot Appendix 1 (tabel 1), 6x MRI in twee weken is wat aan de ruime kant. We hebben het teruggebracht naar max 3x MRI in de twee weken die volgen op stroke inductie (dezelfde hoeveelheid sessies die is toegepast in CONTRAST 1.0). De hersteltijd tussen bv de eerste keer anesthesie (voor baseline MRI of inductie van hypertensie) en de inductie van stroke is minimaal een werkdag. Voor de MRI-sessies die daarop volgen kan het van belang zijn twee metingen kort na elkaar uit te voeren, bijvoorbeeld 12 uur na inductie van ischemie, om zo een ontwikkeling van de lesie te kunnen volgen. We beseffen ons dat dit een korte hersteltijd is maar dit kan essentieel zijn voor het beantwoorden van een relevante onderzoeksvraag. We zullen

in ieder geval het ongerief van anesthesie begrenzen door de maximale duur van 2.5u per dag en de maximale hoeveelheid van 3 sessies per week niet te overschrijden.

Bijlage 3

A. De dieren

Het aantal aangevraagde dieren voor de fok is 1000 dieren, gebaseerd op een benodigd aantal proefdieren van 648, terwijl dit laatste volgens de DEC 324 zou moeten zijn. Wilt u dit nagaan en eventueel corrigeren?

Dit getal klopt inderdaad niet, waarvoor excuus. We zijn op een iets hoger getal van 444 uitgekomen.

De helft van de dieren in studie 1 en 3 heeft genetische aanleg voor hypertensie, dit komt neer op een totaal van ongeveer $(198+205)/2 = 202$ dieren. Dit is $\sim 25\%$ van het totale aantal dieren in deze aanvraag. Om ook nog wat post-mortem dieren met genetische hypertensie te kunnen inzetten voor deze twee studies schatten we dat 25% van de post-mortem groepen ook genetische aanleg voor hypertensie moet hebben ($80 \cdot 0.25 = 20$). Tel deze groepen op om het totaal benodigde genetisch gemanipuleerde dieren te krijgen: $202 + 20 = 222$. Dan hebben vermenigvuldigen we dit getal met een schatting van de uitval (50%; zie appendix 3 pagina 2), dan arriveren we op $222/0.5 = 444$.

De DEC ziet ook nadelen van eigen fok t.o.v. aankoop bij een commerciële leverancier. Kunt u duidelijk onderbouwen wat de meerwaarde van het eigen fokprogramma is?

Zoals reeds uitgelegd in Appendix 3 (pagina 1), zijn de dieren die we nodig hebben om primaire hypertensie te modelleren (genetische gemanipuleerde dieren) alleen beschikbaar in de VS en China. Dit betekent dat elk dier via de luchthaven van Kopenhagen naar Nederland moet reizen, wat ongerief veroorzaakt dat verijd kan worden. Het zelf fokken van deze dieren kan bijdragen aan verfijning van de experimenten.

We hebben het volgende nogmaals onderstreept in het proposal document (pagina 11):

Of note, genetically manipulated animals under consideration for our studies are currently only available from commercial sources on other continents and transporting all of them to the Netherlands will incur significant discomfort that can be avoided. We plan to breed them ourselves instead (see Appendix 3).

De belangrijkste reden voor eigen fok is dus dat het lastig is om de gewenste soort aan te kopen bij een preferred supplier in Europa, tenzij we ervoor kiezen om elk dier een lange reis af te laten leggen. We verwijzen hierbij naar het fokbeleid van de UU: <https://ivd-utrecht.nl/nl/infocentrum/document/beleid-aanschaf-en-fok-van-proefdieren>.

Kunt u de argumenten geven waarop de keuze voor de SHR of DSS rat zal worden gemaakt?

Voor het antwoord op deze vraag refereer ik terug naar het antwoord op vraag 2 van dit document, en box 3.4. Het komt erop neer dat elk hypertensiemodel (primair of secundair) een uniek karakter heeft dat bepaalde aspecten van de aandoening nabootst. Het SHR model heeft een sterk genetisch karakter, deze dieren ontwikkelen hypertensie vanzelf en representeren een bepaalde fractie van de hypertense populatie. De DSS daarentegen, heeft naast de genetische aanleg, een zoutdieet nodig als trigger voor hypertensie. Men zou kunnen stellen dat dit model de

zout-geïnduceerde hypertensie in de patiëntpopulatie nabootst. Meer informatie kunt u teruglezen in Lerman et al (2019). Dit stuk is ook meermaals geciteerd in de hoofdvraag.

In antwoord op de vraag of we nu al kunnen kiezen voor een bepaalde strain: beide modellen bootsen relevante oorzaken van hypertensie na, die interacties aan kunnen gaan met de gevolgen van herseninfarct en de behandeling daarvan. We willen goed nadenken over welke strain we gaan gebruiken door in gesprek te gaan met experts, en niet nu al het ene of het andere model uitsluiten. Wij denken dat deze strategie geoorloofd is, omdat er geen reden is om aan te nemen dat een SHR meer ongerief ondervindt dan een DSS (NB: we verwachten niet we DSS pas hypertensie laten ontwikkelen als ze meer dan een jaar oud zijn).

In de tabel ontbreekt de gevraagde onderbouwing van uw keuzes bij ieder onderdeel. Kunt u dit aanvullen?

We vermoeden dat u verwijst naar de tabel in Box B, onder de kop "Provide justifications for these choices". De onderbouwing is toegevoegd per onderdeel, aangegeven met gele markering (pagina 3).

De (SHR) dieren ontwikkelen al vroeg hypertensie en de gevolgen daarvan worden ernstiger met toenemende leeftijd. In welk stadium en op welke leeftijd moeten de dieren worden ingezet en hoe gaat u te werk om het ongerief ten gevolge van de hypertensie te beperken?

Zoals vermeld in appendix 3 beginnen SHR dieren vanaf 30 weken progressiever nierschade te ontwikkelen. Het gaat hier expliciet niet om nierfalen. In Hülstrom (2012), geciteerd in appendix 3, staat: "Hypertensive kidney damage is not morphologically evident before 30 weeks of age [11,12]. The damage then progresses with increasing age, but does not generally cause renal failure." Na overleg met de IvD (mailwisseling) is bepaald dat dit ongerief als mild bestempeld kan worden, en we laten dieren niet ouder worden dan 18 maanden om de gevolgen te beperken (zie ook appendix 3, pagina 4).

Het ongerief is als licht geclassificeerd, maar er wordt mogelijk een humaan eindpunt bereikt (i.v.m. nierschade). Dit lijkt met elkaar in tegenspraak. Kunt u de ongeriefclassificatie toelichten? Kunt u dit ook in bijlage 1 meer toelichten?

Na overleg met de IvD (mailwisseling) is bepaald dat progressieve nierschade, waardoor SHRs gekenmerkt worden, als mild ongerief beschouwd kan worden (het gaat hier expliciet niet om nierfalen). Echter omdat de nierschade progressief is, kunnen we er redelijkerwijs vanuit gaan dat nierfalen op gegeven moment een risico zou kunnen worden: nierfalen is onomkeerbaar, het is niet verenigbaar met onze studiedoelen en ook niet meer te classificeren als licht ongerief. We willen escalatie van ongerief voorkomen, en alert blijven op onverwachte effecten van langdurige hypertensie en ouderdom, daarom laten we deze dieren niet ouder worden dan 18 maanden. De HEP is geïnccludeerd zodat ingegrepen kan worden bij gevallen van onvoorziene complicaties optreden die tot ernstig ongerief zouden kunnen leiden.

Om bijlage 1 te verduidelijken is het volgende toegevoegd aan pagina 2:

"We will not use rats older than the age of 18 months, because SHRs are known to develop progressive kidney damage as hypertension persists throughout the lifecycle. We expect the same damage occurs to DSS rats. Hypertensive kidney damage is not morphologically evident before 30 weeks of age. The damage then progresses with increasing age, but does not generally cause renal failure (Hultström, 2012). The gradual buildup of kidney damage may cause kidney failure, which

incurs unacceptable discomfort. We will stay alert to the signs of kidney damage and we will not use animals older than 18 months in our studies to minimize this risk."

Niet Technische Samenvatting

Kunt u de aantallen controleren op juistheid en waar nodig aanpassen?

De aantallen zijn aangepast na nieuwe bijwerkingen. Deze zijn nu lager, mede omdat de dieren die gefokt worden in appendix 3 per abuis dubbel geteld werden, terwijl het gros meegenomen had moeten worden naar appendix 1. De mogelijke surplus van appendix 3 is wel meegeteld.

De verdeling van de aangevraagde dieren over de 3 appendices ziet er nu zo uit:

	pilots	hoofdstudies
Appendix 1	200	886
Appendix 2	100	115
Appendix 3 (fok)		222 (alléén mogelijke surplus)

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Dit project is exploratief en onderdeel van een groot consortium waar bijna alle Nederlandse academische medische centra aan deelnemen, met als voornaamste doel de vooruitzichten voor patiënten die een herseninfarct hebben gehad te verbeteren. Deze aanvraag is specifiek gericht op expertisegebied MRI en is een vervolg op aanvraag AVD1150020184985, waar onlangs een Beoordeling Achteraf voor afgerond is. Men wil met deze vervolgaanvraag voortbouwen op de resultaten uit het vorige project. De nieuwe onderzoeksvraag is, of behandelfalen na beroerte te verklaren is door verschillen in de ██████████ van het brein bij hypertensiepatiënten met een afwijkende ██████████ van het weefsel, met ouderdom als te bestuderen variabele. Hiervoor worden zowel chronisch hypotensieve ratten gebruikt, alsmede een groep (gemodificeerde) ratten (fok met ongerief) geïnduceerd met chronische hypertensie.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën, te weten fundamenteel en translationeel onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is middels MRI nagaan welk effect hypertensie op de reperfusie na een herseninfarct heeft. Men onderzoekt daarbij het [REDACTED] en de [REDACTED]. Als onderdeel van een onderzoeksconsortium is het uiteindelijke doel van het project om bij te dragen aan het verbeteren van de vooruitzichten voor mensen die een herseninfarct hebben gehad. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het beeldvormende onderzoeksveld en de behoeften vanuit de cardiovasculaire gezondheidszorg.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, onderzoekers en het consortium met de financierende instantie en startup, en (toekomstige) patiënten met een beroerte. De (genetisch gemodificeerde) ratten hebben er als proefdieren een groot belang bij gevrijwaard te blijven van de experimenten, het ongerief en de vroegtijdige dood. De onderzoekers en de partners in het consortium hebben, evenals de financierende instantie en de startup die betrokken zijn bij dit onderzoek, een groot belang bij dit onderzoek om met de resultaten mogelijk bij te kunnen dragen aan verbeterde vooruitzichten voor patiënten die verhoogd risico hebben op een herseninfarct. (Toekomstige) beroerte-patiënten en de klinici in de gezondheidszorg hebben er ook een groot belang bij omdat deze wetenschappelijk onderbouwing meer kennis en begrip over de impact van hypertensie in relatie tot een beroerte en een mogelijke (preventieve) therapie verkregen wordt. Deze kennis zou dan de kwaliteit van leven van de vele patiënten met een beroerte en hun families kunnen verbeteren.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de ervaren onderzoeksgroep met o.a. de diermodellen, neuro-MRI en microchirurgie en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet met een pilotstudie t.a.v. de kandidaat-neuroprotectieve behandelingen voorafgaand aan de hoofdstudie, en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC vindt dat in het project de aantallen dieren, met name voor de trainingen, plus de criteria waarop de keuze van de hypertensiemodellen gebaseerd zullen worden, (uitgebreider) onderbouwd had kunnen worden. Een ander aandachtspunt voor de DEC was de occlusietijd. Om de invloed van o.a. occlusietijd na te gaan is het essentieel om diverse occlusietijden te gebruiken. De onderzoeker heeft volgens de DEC voldoende de range tussen het opwekken van de beroerte en de behandeling, en het maximale aantal occlusietijden toegelicht. De gekozen

strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

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

Bijlage 3 is een vergunningsaanvraag t.a.v. de benodigde gemodificeerde ratten: Spontaneous Hypertensive Rat (SHR) of Dahl Salt-Sensitive rat (DSS). Het gaat niet om een GMO maar om een fenotype waarbij dieren met spontane hypertensie geselecteerd worden. Het betreft wel fok met ongerief. Er is een surplus van 50% i.v.m. het benodigde fenotype nodig; het dier moet een bloeddruk hebben binnen de marges die de onderzoeker verwacht, zoals beschreven in de literatuur. Dieren *zonder* of met *onvoldoende* hypertensie-ontwikkeling kunnen niet geïncubeerd worden. De ratten zullen, volgens IvD-beleid, aangekocht of zelf gefokt worden omdat anders overzees transport plaats moet vinden en dat is extra belastend voor de dieren.

10. De dieren worden deels gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. De dieren worden sociaal gehuisvest maar na de chirurgische ingreep moeten de ratten maximaal 72 uur individueel gehuisvest worden om goed te kunnen herstellen. De DEC ziet de noodzaak hiervan in.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is volgens de DEC realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het cumulatief ongerief ontstaat met name door de inductie van de beroerte en de meerdere malen anesthesie i.v.m. de operatie en de MRI-scans. Bij 20% van de dieren zal naar verwachting, op basis van eerdere ervaring van de onderzoekers, ernstig ongerief optreden door met name het induceren van een laesie door occlusie waarbij onvoldoende functieherstel mogelijk is. Alle beeldvormende experimenten en de operatie worden onder volledige anesthesie uitgevoerd en de dieren krijgen pijnstilling toegediend. In dit project is het tevens noodzakelijk dat een deel van de ratten hypertensie ontwikkelt (bijlage 3). Hiervoor worden genetisch gemodificeerde ratten aangekocht of zelf gefokt (fok met ongerief), zie C9.

De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de mate van ongerief bij het induceren van een beroerte onder anesthesie, waardoor halfzijdige verlamming ontstaat. Er is volgens de DEC mogelijk minder sprake van pijn maar wel van welzijnsaantasting, één dag na de operatie door o.a. angst en halfzijdige verlamming. Het functioneren van het dier zelf kan ook ernstig verstoord zijn (fijne motoriek is weg zo zal uit gedragstesten blijken). Dieren die bijkomen hebben voor een korte periode halfzijdige uitvalsverschijnselen maar deze functie wordt heel snel door de andere hersenhelft overgenomen, indien het dier goed uit de operatie komt. Bij een klein percentage van de dieren wordt de functie echter niet goed overgenomen. Daarvan worden de dieren hyperactief door verstoorde hersenfunctie, waardoor ze bijvoorbeeld niet meer eten, of de dieren kunnen juist bijna niets meer. Indien dit niet met een HEP te voorkomen is, is er volgens de DEC sprake van ernstig ongerief. De onderzoeker erkent dit en heeft daarnaast zelf aangegeven dat het essentieel is ervoor te zorgen dat de dieren een dag na de ingreep gemakkelijk kunnen eten en geen obstakels hebben. De DEC onderschrijft de mate van ongerief en de gradatie in ernstig en matig ongerief.

De DEC heeft verder gesproken over de mate van ongerief door de meerdere malen anesthesie in een relatief korte periode. De DEC ziet de contrastvloei stof en de herhaalde anesthesie met recovery, ondanks de hersteltijd, als een belasting voor de dieren. De DEC kan zich vinden in de overwegingen.

12. De integriteit van de dieren wordt met name fysiek en gedragsmatig aangetast door de modificatie en doordat een beroerte chirurgisch geïnduceerd wordt waarbij het dier halfzijdig verlamd kan raken.
13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren (< 5%) dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat waarbij met name zorgvuldig het lichaamsgewicht en de mobiliteit gemonitord wordt als indicatoren.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De DEC heeft bediscussieerd of het onderzoek niet in humane patiënten uitgevoerd zou kunnen worden. De onderzoeker heeft voldoende toegelicht dat dit niet mogelijk is in verband met de situatie van de getroffen patiënt, toestemming van de familie en tijdsdruk omdat de eerste uren na de beroerte cruciaal zijn voor het verdere ziekteverloop, en daardoor voor het onderzoek. De onderzoekers verwerken data verkregen van de MRI-scans in een databank waardoor mogelijk in een later stadium onderzoeksvragen *in silico* beantwoord kunnen gaan worden.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat, al kan de DEC dit voor de 'training' niet inschatten aangezien de onderbouwing onvoldoende inzichtelijk is. Er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt

gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Zo kunnen bij ieder dier meerdere malen metingen uitgevoerd worden omdat MRI als beeldvormingsmethode gebruikt wordt, waardoor minder dieren nodig dan bij andere technieken waar wel beschadiging optreedt.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd, waaronder een warmtematras in de kooi voor herstel na de chirurgische ingreep.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood voor het postmortem verkrijgen van hersenweefsel voor verdere analyse. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk nagaan of behandelfalen na beroerte bij sommige patiënten te verklaren is door een primaire hypertensie, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt. Voor dit onderzoek moeten daarom chronisch hypertensieve ratten geselecteerd worden, waarvoor onder meer ratten met hypertensie-ontwikkeling door fok met ongerief ingezet worden. Deze hypertensie tast onvermijdelijk het welzijn van de dieren aan. Het onderzoeksdoel en gekozen procedures rechtvaardigen het gebruik van proefdieren. De keuze voor genetische geselecteerde proefdieren is ook noodzakelijk omdat een chronische hypertensie (vergelijkbaar met de status van bepaalde groepen patiënten) op een andere wijze niet te realiseren is.

2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de maximaal 1523 proefdieren plaats, met terminaal (100 dieren), licht (222 dieren), matig (981 dieren) en ernstig (220 dieren) ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project ertoe bijdragen dat er meer kennis is over de [REDACTED] en de [REDACTED] [REDACTED] na een herseninfarct, vooral ook bij patiënten, die reeds aan hypertensie leiden. Het is aannemelijk dat de fundamentele en de translationele doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van (gemodificeerde) proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de fok (met ongerief) van de gemodificeerde ratten én het onderzoek naar [REDACTED] in de hersenen en de invloed van de neuroprotectieve middelen [REDACTED] en [REDACTED] met ouderdom als te bestuderen variabele, van groot belang is voor toekomstige patiënten (en medici) en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De DEC heeft in de afweging o.a. de gradatie in de mate van ongerief bij het induceren van een beroerte, de herhaaldelijke anesthesie en de fok met ongerief van de ratten meegenomen. Hypertensie is echter een veelvoorkomende co-morbiditeit bij humane patiënten en het betreft vaak oudere mensen die getroffen worden door een beroerte. Na een beroerte overleeft een aanzienlijk deel van deze groep mensen een beroerte niet of is de kwaliteit sterk afgenomen waardoor voor veel patiënten blijvende zorg noodzakelijk is. Alles afwegend vindt de DEC het onderzoek voldoende relevantie hebben om de experimenten en het ongerief bij de dieren te kunnen verantwoorden. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald lijkt te kunnen worden (al is dat voor de 'training' nog onvoldoende inzichtelijk), dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd. Aangezien een deel van de dieren, ondanks de toepassing van humane eindpunten, ernstig ongerief kunnen ervaren, zal achteraf een reflectie op het project en het ongerief door middel van een Beoordeling Achteraf nodig zijn.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Buiten de context

Buiten de context heeft de DEC geconstateerd dat dit onderzoek bijdraagt aan een oplossing voor deels mogelijk vermijdbare leefstijlgerelateerde problematiek van mensen waarvoor nu proefdieren ongerief moeten ondergaan. De aanvrager heeft afdoende beargumenteerd waarom het onderzoek niet op humane patiënten kan worden uitgevoerd en de DEC is uiteindelijk van mening dat het onderzoek voldoende relevantie heeft om de experimenten en het ongerief bij de dieren te kunnen verantwoorden.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202418345

Bijlagen

2

Datum 5 september 2024

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 september 2024. Het gaat om uw project "The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke: CONTRAST 2.0". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202418345. 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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

5 september 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202418345



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Translational Neuroimaging Group
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Translational Neuroimaging Group
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 oktober 2024
Geplande einddatum: 30 september 2029
Titel project: The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke: CONTRAST 2.0
Titel niet-technische samenvatting: Op zoek naar oorzaken van behandelfalen na een ischemische beroerte.
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 2.259,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

 Projectvoorstel Beschrijving Dierproeven Niet-technische samenvatting**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utrecht

Datum:

26 augustus 2024



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD11500202418345
Bijlagen
2

Datum 5 september 2024
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 5 september 2024
Vervaldatum: 5 oktober 2024
Factuurnummer: 2418345
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202418345	€ 2.259,00

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 te 's Gravenhage.

From: [REDACTED] on behalf of [Centrale Commissie Dierproeven](#)
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)
Cc: [REDACTED] "dec-utrecht@umcutrecht.nl"
Subject: FW: Aanhouden AVD11500202418345
Date: donderdag 30 januari 2025 15:21:40

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 04-09-2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke: CONTRAST 2.0" met aanvraagnummer AVD11500202418345. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- Door het benoemen van de werkgroep waar uw onderzoek onderdeel van is kan worden achterhaald welke groep dit onderzoek heeft uitgevoerd, waardoor de NTS niet meer anoniem is. Kunt u deze referenties uit de NTS verwijderen?

- In uw NTS onder de kop 'replacement' gebruikt u de term 'in-vitro'. Deze term zal voor het algemene publiek lastig navolgbaar zijn. Kunt u deze term aanpassen of uitleggen?

- U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

Onduidelijkheden

- In bijlage dierproeven 3 geeft u onder de tabel in B. zowel 222, als 444 dieren aan. Kunt u verduidelijken dat er in deze bijlage enkel 222 dieren zullen worden ingezet door 444 te verwijderen?

- In de bijlagen dierproeven 1 en 2 geeft u aan dat een deel van de dieren tijdelijk individueel gehuisvest zullen worden. Echter is er onder C. aangekruist dat de dieren conform de richtlijn 2010/63/EU worden gehuisvest. Kunt u dit aanpassen in de bijlagen dierproeven?

- In de bijlage dierproeven 2 is onderdeel D. niet volledig ingevuld. Kunt u dit aanvullen?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven



www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag

Datum 10 februari 2025
Betreft Reactie "aanhouden AVD11500202418345"

Division Imaging & Cancer

**Translational Neuroimaging
Group
Center for Image Sciences**

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Bijgaand een puntsgewijs antwoord op uw vragen betreffend AVD11500202418345.

Hoogachtend,

[Redacted signature]

Bijlage Rebuttal AVD11500202418345

Address:
Translational Neuroimaging
Group
Building Nieuw Gildestein
Yalelaan 2
3584 CM Utrecht
The Netherlands

Niet technische samenvatting

- Door het benoemen van de werkgroep waar uw onderzoek onderdeel van is kan worden achterhaald welke groep dit onderzoek heeft uitgevoerd, waardoor de NTS niet meer anoniem is. Kunt u deze referenties uit de NTS verwijderen?

Alle verwijzingen naar "CONTRAST" en het consortium zijn verwijderd.

- In uw NTS onder de kop 'replacement' gebruikt u de term 'in-vitro'. Deze term zal voor het algemene publiek lastig navolgbaar zijn. Kunt u deze term aanpassen of uitleggen?

De term "in vitro" is vervangen door een specificatie: "Modellen waarbij onderzoek wordt uitgevoerd buiten de biologische context van een levend wezen [...]"

- U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

De NTS is herzien en ingevuld in het juiste Excel bestand.

Onduidelijkheden

- In bijlage dierproeven 3 geeft u onder de tabel in B. zowel 222, als 444 dieren aan. Kunt u verduidelijken dat er in deze bijlage enkel 222 dieren zullen worden ingezet door 444 te verwijderen?

Het gaat inderdaad om 222 dieren die we nodig hebben uit appendix 3. Het aantal van 444 dieren betreft deze 222 *inclusief* mogelijke uitval (50%). Als dieren uit appendix 3 het juiste fenotype hebben verhuizen ze door naar appendix 1 en tellen daarom niet mee met het eindtotaal dieren dat we aanvragen, alleen mogelijke uitval telt mee. Het is begrijpelijk dat deze notatie onduidelijk is en daarom is het aantal in appendix 3 vervangen door 222.

- In de bijlagen dierproeven 1 en 2 geeft u aan dat een deel van de dieren tijdelijk individueel gehuisvest zullen worden. Echter is er onder C. aangekruist dat de dieren conform de richtlijn 2010/63/EU worden gehuisvest. Kunt u dit aanpassen in de bijlagen dierproeven?

In appendix 1 en 2 is nu bij onderdeel C het hokje "nee" aangekruist. De bijgaande tekst is aangepast, welke aangeeft dat we er altijd naar streven om dieren conform de richtlijnen te huisvesten, hier kan echter van afgeweken worden om post-operatief herstel te bevorderen.

- In de bijlage dierproeven 2 is onderdeel D. niet volledig ingevuld. Kunt u dit aanvullen?

Onderdeel D in appendix 2 is aangevuld.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202418345

Bijlagen

3

Datum 14 februari 2025

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 4 september 2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke: CONTRAST 2.0" met aanvraagnummer AVD11500202418345. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 14 februari 2025 tot en met 13 februari 2030.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2031 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

14 februari 2025

Aanvraagnummer:

AVD11500202418345

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 2 december 2024. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 30 januari 2025 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op aanpassingen in de niet-technische samenvatting en verheldering van het aantal dieren, huisvesting en pijnmanagement van de dieren. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2031 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

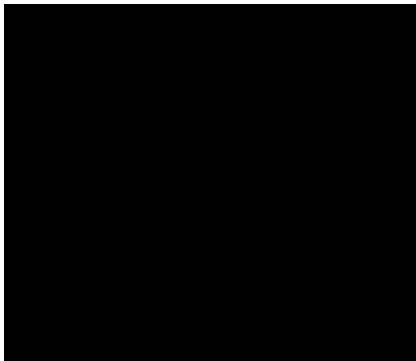
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving

Datum:
14 februari 2025
Aanvraagnummer:
AVD11500202418345



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 februari 2025 tot en met 13 februari 2030, voor het project "The sequel to Collaboration for New Treatments in Acute Stroke: CONTRAST 2.0" met aanvraagnummer AVD11500202418345, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is ██████████ Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 4 september 2024
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 11 februari 2025;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1. Revealing determinants of futile recanalization with MRI in animal models of stroke, zoals ontvangen op 11 februari 2025;
 - 3.4.3.2. Testing the efficacy of ██████████ and ██████████ for neuroprotection in an animal model stroke, zoals ontvangen op 11 februari 2025;
 - 3.4.3.3. Locally breeding genetically hypertensive rats, zoals ontvangen op 11 februari 2025;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 11 februari 2025;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 2 december 2024
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 11 februari 2025.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1. Revealing determinants of futile recanalization with MRI in animal models of stroke			
	Ratten (Rattus norvegicus)	1.086	9,0% Terminaal 16,0% Ernstig 75,0% Matig
3.4.3.2. Testing the efficacy of ██████████ and ██████████ for neuroprotection in an animal model stroke			
	Ratten (Rattus norvegicus)	215	20,0% Ernstig 80,0% Matig
3.4.3.3. Locally breeding genetically hypertensive rats			
	Ratten (Rattus norvegicus)	222	100,0% Licht

Aanvraagnummer: AVD11500202418345

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2031 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD11500202418345

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD11500202418345

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.