

	Inventaris Wob-verzoek W17-09								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017842								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x			x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x			x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie aanvulling aanvraag				x		x	x	
9	Projectvoorstel nieuw				x			x	
10	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw				x			x	
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

20 MRT 2017



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Academic Medical Center Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 4 3 3 6 2 7 7 7</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7									
Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Meibergdreef</td><td>31</td></tr><tr><td>Postbus</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1105AZ</td><td>Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL68RABO0136166741</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Meibergdreef	31	Postbus			Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam	IBAN	NL68RABO0136166741		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC	
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31															
Postbus																	
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam															
IBAN	NL68RABO0136166741																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2">Principal Investigator/Onderzoeker</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">@amc.uva.nl</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	Principal Investigator/Onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	@amc.uva.nl	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	Principal Investigator/Onderzoeker																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	@amc.uva.nl																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2">laboratorium Analyst</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	laboratorium Analyst		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	laboratorium Analyst																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

☐ Dhr. ☐ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag

☒ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 01 . 06 . 2017

Einddatum 01 . 06 . 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Zenuwprikkeling als therapie tegen chronisch darmontsteking ziekten

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC AMC

Postadres Meibergdreef 31

E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035.00 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 17 - 03 - 2017

Handtekening 



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | <u>11800</u> |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | <u>Academic Medical Center</u> |
| 1.3 | Vul de titel van het project in. | <u>Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice</u> |

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.
-

This project concerns fundamental and applied research questions.

The central hypothesis of this study is that intervening with neuronal innervation of lymphoid organs affects immune responses that are important in chronic inflammatory diseases (termed Immune-Mediated Inflammatory Diseases (IMIDs)). These responses include events such as lymphocyte trafficking and immune cell activation through pattern recognition receptors.

General goals of the research are to test and validate neuronal intervention techniques (i.e. denervation and stimulation) to treat chronic inflammatory diseases, such as Inflammatory Bowel Disease (IBD, or colitis, but we will refer to IBD for clarity throughout this text).

Rationale for this project:

Modulation of vagus nerve activity by stimulating the vagal nerve at cervical or subdiaphragmatic level has been demonstrated to affect immune responses in vivo: stimulation reduced systemic and local inflammation (Borovikova et al, Nature 2001; deJonge et al, Nat Immunol 2005), whereas denervation augments inflammation (Oliver et al, Eur J Immunol 2016). The mechanism underlying neuro-immune modulation is unclear and it is believed that a better understanding will allow novel treatment of IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Nerve activity can affect immune responses because of the neurotransmitter receptors that are expressed on immune cells. As lymphoid organs are intensely innervated by particularly sympathetic fibers, nerve stimulation can have broad immune modulating effects relevant for IBD pathogenesis, even without the need for direct innervation of inflamed tissue. Neurotransmitter receptor activation affects multiple immune cell functions, such as cell trafficking to lymphoid organs (Kanai et al, J Exp Med 2015), cytokine production, and pathogen phagocytosis and killing. All of these are relevant for IBD pathogenesis. Clinical trials of nerve stimulation to reduce inflammation are already underway (Bonaz et al, Neurogastro Mot 2016) and are well received among patients (Zitnik, Ann Rheum Dis. 2011), underscoring the safety, feasibility and societal urgency of nerve stimulation using implantable devices to reduce inflammatory responses, i.e. the topic of this project.

For this project we choose IBD as an immune mediated disease for the reason that: 1) IBD is a relatively prevalent diseases for which a great unmet need for treatment exists, 2) clinical trials of vagal nerve stimulation have already been performed in IBD (clinical trial NCT02311660), (and rheumatoid arthritis; clinical trial NCT01552941) and show efficacy in ameliorating disease likely via reduction of macrophage TNF release (neutralizing TNF using anti-TNF is an end point therapy for these patients), 3) well established rat and mouse models for IBD exist. The latter supports the societal significance and potential clinical application of the proposed project.

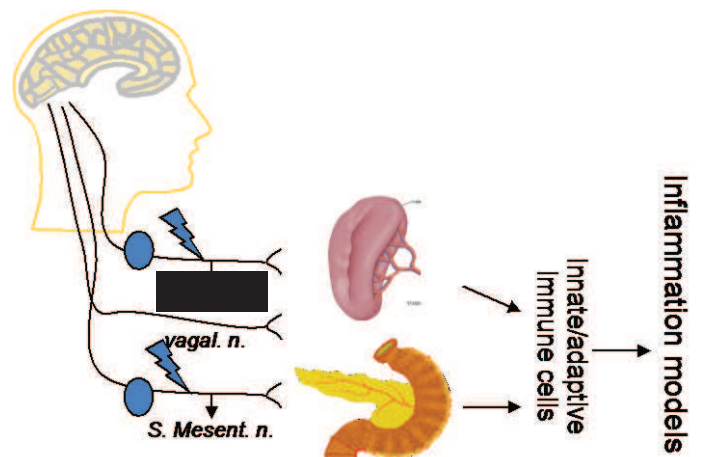
Our previous work in this area (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013) and that of others (Martelli et al, J Physiol 2014) led us to assume that not only the vagal (parasympathetic) nerve, but also nerves of the sympathetic system are able to mediate immune modulation. In particular, nerves projecting to the [redacted] (Kanai et al, J Exp Med 2014) may mediate the modulation of the immune response by the vagus nerve. This was concluded from studies where [redacted] (removal of the

██████ abolishes the effect of vagal nerve stimulation (Ji et al, Muc Immunol 2014). Moreover, sympathetic neurotransmitters are more immune-modulatory than parasympathetic neurotransmitters (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013). These data suggest that vagal nerve stimulation indirectly stimulates ██████ innervation (indirectly, because no direct connection in the coeliac plexus between vagus nerve and ██████ innervation was ever demonstrated (Martelli et al, Exp Physiol 2016), although vagal fibers may reach the ██████ (Buijs et al, PLOS ONE 2008). Irrespective, vagus nerve stimulation has very pleiotropic effects because of the many organs innervated by the vagal nerve. This project's aim is to show that direct stimulation of sympathetic nerve bundles to the ██████, or to the intestine, is a more effective approach than vagus nerve stimulation.

Nerve fibers to the ██████ are organized around the ██████, in a plexus around the artery. We will refer to this plexus as the ██████. Similar to ██████ nerve stimulation, stimulating the output of the sympathetic innervation of the intestine, including intestinal lymphoid tissue via the **mesenteric nerve plexus** that surrounds the mesenteric artery, may be effective in the treatment of IBD. Sympathetic nerves that innervate immune cells in intestinal lymphoid tissue and mucosa can probably reduce IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Notably, the ██████ and mesenteric lymphoid organs jointly mediate immune activation in IBD. See for a schematic illustration of neural routes Fig 1.

Because the neuro-modulatory intervention appears to be relevant for the therapy of IBD, we have designed nerve "cuffs" (devices that enclose the nerve to allow electrical activation of the nerve fibers) that can be implanted (see Fig 2 for an illustration of the cuffs). Such cuffs can also be used to stimulate the nerve plexus and include the artery that is attached to it, as described above. Our industrial partner GlaxoSmithKline Bioelectronics (now Galvani Bioelectronics) has the intention to bring such devices to the market for treatment and, therefore, supports this research.

Fig. 1. The proposed experimental setup. Specific nerves will be denervated or stimulated to affect chronic inflammatory disease.



The choice for rat and mouse experiments.

We have developed nerve cuffs to fit on the mesenteric, vagal, and ██████ nerves over the past years. Because these initial nerve cuffs were relatively large and required a direct connection with external impulse generators, we used rats to implant the cuffs and test their ability to reduce IBD. In these experiments, chronically implanted electrodes were attached to adaptors that were cemented on the head of the rat to allow daily stimulation without the need for anesthesia. These implanted devices delivered proper pulses to the targeted nerve for over 21 days. The nature of electrical stimulation of the nerve bundle (i.e. the settings of the impulse generator) is important for the response to optimize the ratio of the desired (anti-inflammatory) and unwanted effects (e.g. altered perfusion of the organ). Because of our experience with the rat IBD model, stimulation parameters such as impulse frequency (1-20 Hz), applied current (10-200 μ A), and pulse duration (10-1000 μ sec) can be optimized without the need for first adapting the system to the experimental animal (a mouse is 10x smaller than a rat).

Rat models for IBD are less well developed. In contrast, various mouse models for IBD are available to better study aspects of IBD that are relevant to human IBD (a discussion of rats and mice as experimental models for IBD can be found in te Velde et al (IBD 2007) and Zeeff et al (IBD 2016)). Furthermore, mouse models offer additionally the availability of genetically modified strains that allow intervention with the expression of specific genes (e.g. neurotransmitters and their receptors) and the

tracing of cells. Moreover, more reagents for analyses, such as antibodies for complex FACS sorting panels, are available for mice. These complex FACS sorting experiments are necessary to identify which cells respond to nerve stimulation in the targeted organ. We, therefore, plan to switch to mouse models for IBD once we have characterized the electrical settings and responses of the implanted cuffs in rats.

Summarizing, we aim to:

- 1) Optimize the implantation and stimulation protocol for nerve bundles (mesenteric, and vagus nerves) in rat, extending earlier work;
- 2) Test the proof-of-concept of the efficacy of nerve bundle stimulation to reduce disease in rat models of IBD;
- 3) Implement the use of smaller, more appropriate, cuffs in mouse models of IBD that will allow us to better understand the mode of action and thus improve their efficacy by targeting the specific mechanisms that are responsible for the effects. Such implementation also requires smaller head mounts, with which we have already experience via working with our industry partner in this project.

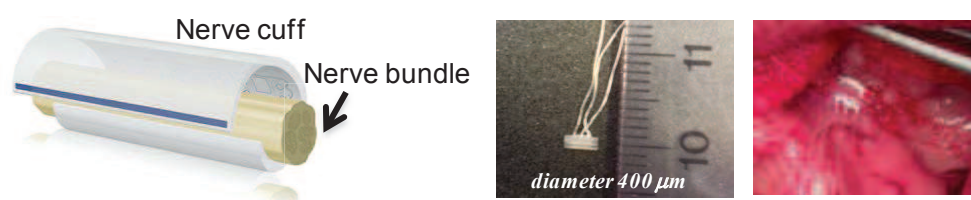


Fig 2. The implanted cuff electrode that will be used for this research. Left panel: nerve cuff, middle panel: illustration of the cuff and its size. Size ranges of 100-500 micrometer will be used depending on nerve diameter. Right panel: illustration of a nerve cuff (prototype) that we plan to use to electrically stimulate a nerve bundle (or plexus) (example: the splenic nerve plexus around the splenic artery).

Rat IBD models. We have experience with IBD models in rats and mice. In rats, we will use the DSS (Dextran Sulphate Sodium)-induced IBD model. In this model DSS is administered via the drinking water and causes damage to the epithelial layer of the colon that, in turn, causes an innate immune cell-driven response in the underlying mucosa leading to IBD.

Mouse IBD models. In contrast to the rat model, mouse models for IBD, including acute and chronic DSS-induced colitis, 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis (TNBS is a hapten that causes a T-cell-driven colitis), and CD45Rb^{high} transfer colitis (transfer of pathogenic T-cells to an immune-compromised host) allow molecular analyses of the immune responses.

Why testing of different mouse models for IBD? The etiology for human IBD (Ulcerative colitis nor Crohn's Disease) is not clear. Maybe for that reason, no specific model human IBD exists. However, the different rat/mouse models described in this project allow us to study different aspects of human IBD, for instance the DSS model is driven by innate pathways, the Tcell transfer model reflects a T cell driven IBD. Such multiple analyses allow modeling of clinically relevant aspects of human IBD, such as the involvement of innate and adaptive immune cells, ulcer and wound healing, barrier function, and involvement of cytokines such as TNF. The combination of mouse models of colitis is, therefore, well suited to study the mechanisms by which neuronal stimulation affects colitis.

It is important to note that these models are very dependent on the microbial status of the animal facility. As the AMC animal facility is just reconstructed and will be re-colonized from mice lines re-derived from other breeders, we need to optimize the conditions for the colitis models. This holds for the acute and chronic DSS-induced colitis, TNBS- induced colitis, and CD45rbhigh induced colitis.

Denervation and stimulation of nerve bundles in IBD models. Specific cuff electrodes to stimulate vagus nerve, and the [redacted] and mesenteric plexus in the rat will be used (Fig 2). Nerve activity will be blocked via surgical denervation. Stimulation and denervation of nerves is anticipated to ameliorate and augment inflammation, respectively, because of the anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation in septic models. However, amelioration of inflammatory disease by nerve activation is not always evident; inflammation involves many actors beyond cytokines, and it will also be relevant to reduce

neuronal activity to achieve modulation of the course of disease, such as shown for modulation of inflammation via the carotid body, which requires inhibition of nerve activity (Sacramento et al, 2016). So the combination of nerve denervation/stimulation will allow a full understanding of the modulation of the inflammatory process, and therefore we include stimulation and denervation experiments in this project. In addition, stimulation of different nerve bundles innervating lymphoid organs, i.e. those in the gut or [REDACTED], or stimulation of the vagus nerve, may be effective in reducing IBD because a general intervention in the immune response is anticipated.

Optimization of the electrical stimulation in disease models. The protocol for electrical stimulation of the nerve bundle needs to be optimized for current, voltage, and pulse duration and frequency. In particular, we need to quantify and optimize the electrical signal delivered to the nerve bundle in its efficacy to affect immune cell activation, such as cytokine and adhesion molecule expression. Therefore the strategy of this project is to optimize the surgery, pulse choice etc in a rat model, before moving on to mouse models, as outlined in Fig 3.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

The central research question is whether intervention with the function of (para)sympathetic nerve bundles can affect the course and pathogenesis of IBD.

Specific research questions:

1. What is the efficacy of selective stimulation of vagal nerve bundle (parasympathetic), mesenteric plexus (sympathetic), or [REDACTED] (sympathetic) on the course of IBD. We will use nerve denervation by surgical techniques to show the opposite effect of nerve stimulation.
2. What is the mechanism of action of the intervention (experiments in mouse models of IBD).

Feasibility of the studies.

Given our prior work and experience with the surgery, the proposed work is feasible within the 5 years timeline. Although many mechanistic questions around neural immunomodulation remain to be answered even following this project, proof of principle of nerve stimulation/denervation to modulate inflammation can be provided in the project time. It should be noted that strict mechanistic experiments, such as neurotransmitter receptor functions and lymphocyte trafficking, can be subsequently addressed in in vitro experiments.

The team (2 FTE lab technicians and 2 postdocs) is well trained in animal surgery. GSK Bioelectronics will take care of the nerve cuffs and stimulators.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Societal interest: Chronic disabling conditions associated with IBD adversely affect patients in terms of physical suffering and pain, impaired function, and diminished quality of life. These persistent relapsing diseases have a significant influence on individual employment status and work-related productivity. In addition, IBD represents a sizable burden on society due to high healthcare and non-healthcare related costs. IBD, which comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), affects about 0.1% of the Western population. IBD affects youth at their prime of life, causing diarrhea, intestinal bleeding, and severe gut discomfort.

So-called biologicals (e.g. monoclonal antibodies and recombinant proteins directed against pro-inflammatory cytokines (like infliximab), or anti-integrin (vedoluzimab) have been demonstrated as very effective. However, none of the novel therapies has induced a lasting remission. Hence, IBD treatment represents a large unmet clinical need.

Scientific interest: It is only recently that we begin to appreciate the role of innervation of lymphoid organs, such as [REDACTED] and lymphoid follicles in the gut. This project wants to explore the possibilities of the neuronal routes to intervene with inflammatory processes, with a focus on IBD. We have already shown that denervation affects the course of intestinal inflammation. The clinical potential of employing neuronal signaling to restore immune balance in the gut is evidenced by the success of ongoing clinical trials of vagal nerve stimulation (VNS) in rheumatoid arthritis (Koopman FA et al, PNAS 2016), and IBD (Bonaz et al, J Physiol 2016). However, the VNS is not only invasive, but also crude (it stimulates the large cervical portion of the vagus that contains both efferent and afferent cholinergic and adrenergic nerves projecting the entire body), and is not based on an appropriate mechanistic concept of action to allow improvement. For instance we showed that the immune cells in colonic mucosa (in IBD) are not directly innervated by the vagus nerve (Cailotto et al, Neurogastro and Mot 2011), so any clinical effect sorted by VNS is by definition indirect. This lack of understanding of the neuronal effector pathways and targeted immune cells hampers further improvement of efficacy of the treatment.

This project will address this issue by stimulating the nerves at a site more distal to the (immune)organ such as [REDACTED], rather than the crude cervical vagal nerve stimulation tested thus far. This with the aim to reduce immune cell activation relevant in IBD. Denervation and stimulation experiments will establish proof of concept for nerve intervention to affect disease course in IBD models. Transcriptional and cellular analyses of immune cells in the targeted tissue will allow titration of the signal. Preclinical analyses are geared towards human spleen innervation. The aim of those studies is to test a prototype for [REDACTED] a pilot IBD patient population. In this project, GSK Bioelectronics and AMC collaborate closely, which will leverage the development of an effective device for use in human IMIDs greatly.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

General strategy of experiments;

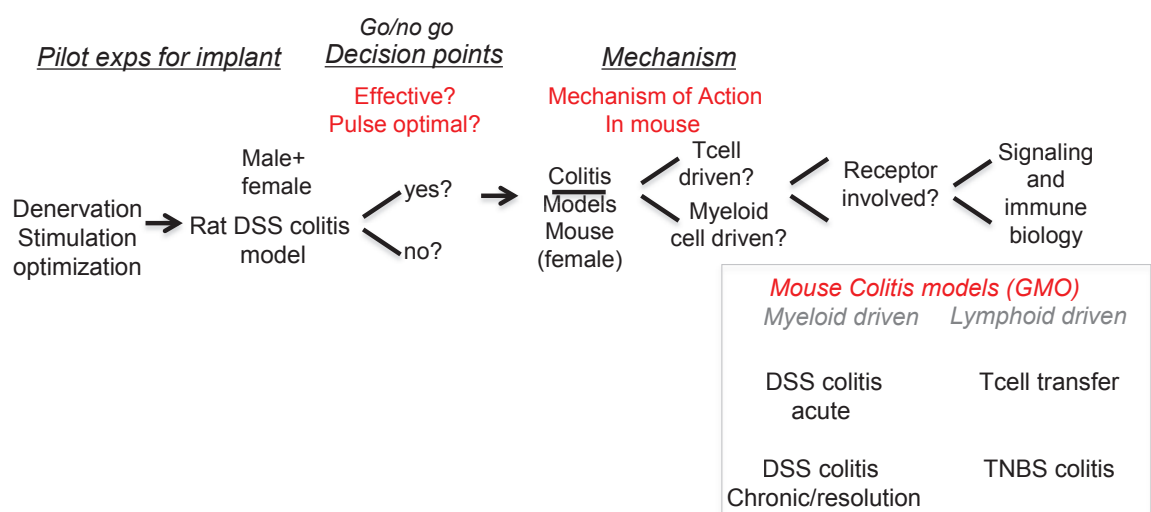


Fig. 3. Strategy of research, including indications of go/noGo points. First, pilot experiments in rat will allow us to pinpoint intervention points in three different nerve bundles (vagal nerve, mesenteric nerve, [REDACTED]). Experiments will be performed to optimize implantation, denervation, and optimal stimulation parameters in acute stimulation experiments in rat. Next we will test efficacy of stimulation in IBD models in rats. In mouse IBD models, female mice are described to be the gender of choice. If stimulation is effective on reducing IBD, the next will be to move to (GMO) mouse models of myeloid- or lymphoid-driven IBD to determine the mechanism of action.

Key objectives and decision points:

- 1- to establish an optimal stimulation protocol for a nerve-bundle or plexus to reduce immune cell activation (by means of stimulation of vagal, mesenteric, or [REDACTED])
- 2- to apply this stimulation in models of IBD in rat to evaluate the inflammatory response that causes disease and to decide on the stimulus given in mouse models in objective 3
- 3- to decipher the mechanism by which stimulation acts on the disease course in mouse models of IBD

Ad 1- optimization of the parameters and surgery of the stimulus given. The stimulation paradigm will be varied (1-frequency, 2-current strength, 3-pulse duration, and other potential parameters that can be determinants in the effective immune-modulation). Optimal stimulation will be determined according to blood flow changes in targeted tissue, as well as measurement of neurotransmitter release, and local cytokine release measurements.

Specific procedures to optimize the parameters of electrical stimulation.

In earlier studies in human, effects of vagal nerve stimulations on the immune response were measured by determining cytokine secretion in blood cells ex vivo stimulated with LPS (Koopman FA et al, PNAS 2016)). Similarly, we will optimize the effects of nerve stimulation on 1) cytokine release in ex vivo stimulated cells from different organs, and 2) acutely after stimulation in vivo. To do the latter, the animal will be injected intraperitoneally with an immune challenge (LPS or other immune stimulator) after a nerve bundle was stimulated (under anesthesia), and immune cells will be collected from peripheral blood or lavage fluid and immune response measured. We aim here to determine the optimal electrical stimulation parameters that affect immune responses relevant to IBD.

Control animals for baseline measurements and sham-stimulated animals are required to ensure that preparing and "cuffing" the nerve alone does not give the same/more/less neurotransmitter release.

Go/no Go: not applicable, the optimal stimulation will be used.

Ad 2- Chronic stimulations of (para)sympathetic nerves using implanted devices. In previous research we have constructed effective cuff electrodes for use in **rat**. For instance, we have adapted these electrodes to fit the superior mesenteric nerve bundles. A similar strategy will be applied for other nerve bundles, such as [REDACTED] and vagal nerves. Gender of Rat/mice; earlier data in mouse colitis models demonstrate a more reproducible outcome in female mice (for reasons outlined in Bijlage), favoring the use of female mice in colitis experiments (fig 4). Generation of disease symptoms will cause fighting behavior and additional stress factors in male mice, compared to female, which will directly affect the outcome of these experiments. We will use both male/female in rat IBD experiments.

Nerve stimulation in inflammation models: After implantation and recovery stimulation will be performed daily in IBD models for specific time intervals. Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol. Details are in the bijlage.

Nerve denervation experiments. We aim to apply selective nerve denervation surgery and assess the effect of specific immune processes mediating IBD. Details are in the bijlage.

Go/no GO decision points: effective reduction of disease in rat IBD. Lack of effect of either nerve stimulation in rat models will be a no-go point to carry out experiments in mice. The ineffective reduction of IBD symptoms in rat models after stimulating a specific nerve will be a no-go for experiments in 3.

Ad 3. Mouse models of colitis. These will be carried out based on the findings on gender (favoring female as in point 2), stimulation, and nerve(s) determined in 2.

Go/no Go decision points: not applicable in this stage, we will use the stimulation, type of nerve, and gender as deduced from 2

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

The strategy of experiment (see also Fig 3). As outlined above, our strategy is to first establish the surgical method and parameters for stimulation in rats because of their size. These experiments will determine gender, type of nerve, and stimulation parameters to be used.

As mouse models for IBD provide better tools to gain insight into the mechanism of action (reviewed in te Velde et al, IBD 2017), we plan to analyze the working mechanisms in mice.

If the (chronic) implantations in rats are successful, implanted cuff electrode and denervation techniques will be adapted to mice to deduce the mechanism of action of efficacious stimulation/denervation protocols.

In general, we have chosen for a staged format of experimentation, **first** optimizing the implantation studies, nerve bundles, and stimulation protocols, **next** determining efficacy in proof of concept experiments in rat, and **third**, to transfer such implanted devices to mice to determine their mechanism of action.

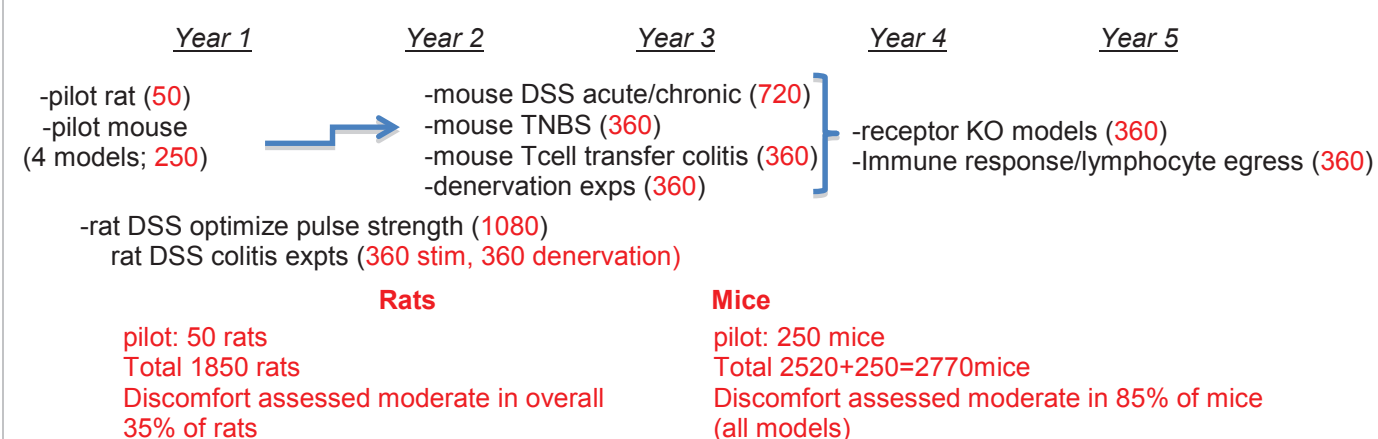


Fig 4. Strategy of experimentation and estimated number of rats and mice used, including assessment of the percentage of those animals suffering discomfort (in red). Numbers mentioned include a pilot phase of experimentation (in red indicated) where we need to establish the IBD models in our new animal facility. For calculation of number of mice/rats and experimental groups please refer to the bijlage.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Research strategy: See also figure 3.

1-Optimization. Nerve stimulation and denervation protocols will be tested in rats, since we have most experience with this model. Using rats instead of mice will avoid a learning curve, which would affect the optimization of the protocol.

2-Proof of efficacy. For the same reasons as stated under 1), we will establish the efficacy of nerve stimulation and denervation protocols in rat models of IBD.

3-Mechanism of action. The availability of rat models of IBD are restricted to DSS. Once we have optimized the protocols, we will therefore turn to mouse models of colitis that are better to tease out mechanism of action.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	intervening with neuronal signaling in rat and mouse experimental IBD
2	
3	
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Zenuwprikkeling als therapie tegen chronisch darmontstekingsziekten
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Zenuwstelsel, immuunsysteem, ontstekingsziekten, nervus vagus, sympathicus

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Het is al decennia lang bekend dat er een nauw verband bestaat tussen het zenuwstelsel en het afweersysteem. In recente studies is vooruitgang geboekt in het gebruiken van deze samenhang voor de behandeling van chronische ontstekingsziekten. Het basisidee is dat het prikkelen van een zenuwbundel het ontstekingsproces in chronische ontstekingsziekten kan remmen. Gebleken is dat het zenuwstelsel een sterkere invloed heeft op ontstekingsprocessen dan eerder werd aangenomen. De wetenschappelijke vraagstelling is of het elektrisch prikkelen van zenuwen een aantrekkelijke behandeling is bij chronische aandoeningen zoals reumatoïde artritis of colitis (aanduiding voor de ziekte van Crohn en colitis Ulcerosa). Uit recente studies bij patiënten is gebleken dat prikkeling van de grootste zenuw van ons lichaam, de nervus vagus, ontstekingen kan
---	---

remmen. Dat leidt tot een vermindering van klachten. De effecten waren meetbaar maar niet zo heel sterk. Toch zijn patiënten blij met deze behandeling omdat er dan geen medicijnen meer nodig zijn.

De prikkeling die wordt gebruikt, is niet specifiek gericht op het ontstoken gebied en het is onbekend hoe zenuwen ontsteking remmen. We verwachten dat zenuwprikkeling beter kan werken als de zenuwen van het ontstoken orgaan zelf worden aangepakt. De behandeling moet dan zo worden aangepast dat de ontstekingscellen geremd worden. Dit willen we in dierenexperimenten aantonen.

In oudere studies werd voornamelijk de grote hersenzenuw, de nervus vagus, geprikkeld. Nu weten we uit recent onderzoek, dat het prikkelen van andersoortige zenuwen, de sympathische zenuwen, veel effectiever zal zijn. Deze zenuwen sturen veel organen aan die betrokken zijn bij de afweer van het lichaam.

In dit project, dat alleen over darmontsteking (colitis) gaat, willen we bewijzen dat er samenwerking is tussen zenuwen die de darm en ook de afweerorganen prikkelen. Als we dan die zenuwen gaan prikkelen willen we kijken of dit de ziekteverschijnselen bij darmontsteking in proefdieren vermindert. Daarbij willen we de sterkte van het elektrische signaal op de zenuwbundel zo goed mogelijk bepalen om een zo groot mogelijk effect op de afweer te hebben.

Nadat de werkzaamheid van onze implanteerbare elektroden in ratten en muizen zal zijn aangetoond, zullen we dezelfde manier van zenuwprikkeling ook in de mens toepassen. Het gebruik bij patiënten van dit innovatieve principe is binnen handbereik, want implanteerbare apparaten voor de behandeling van chronische ziekten zijn reeds goedgekeurd in Amerika.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

We verwachten in dit project te kunnen vaststellen welke elektrische signalen we moeten geven om ontstekingen te remmen, en welke zenuwbanen we daarvoor moeten prikkelen. We verwachten dat dit onderzoek ons meer inzicht zal geven in de werkingsmechanismen van zenuwprikkeling. Hierdoor zullen we in staat zijn zulke elektroden te gebruiken voor patiënten met een chronische ontstekingsziekte van de darmen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Ratten:1850, en 2770 muizen voor onderzoek naar darmontsteking.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Darmontsteking. Een deel van de ratten (35%) en het merendeel (85%) van de muizen zullen te lijden hebben van een ontsteking van de dikke darm. Hierbij ontstaan diarree, bloedverlies bij de ontlasting, en gewichtsverlies (of minder gewichtstoename).

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

In het onderzoek naar darmontsteking, wordt het ongerief wordt voor een deel (ongeveer 65 %) van de dieren ingeschat als "matig", aangezien het een langdurige ontsteking betreft. De andere 35% van de dieren zal licht of geen ongerief ondervinden, aangezien deze zijn ingedeeld in controle groepen.

Het kan zijn dat de zenuwprikkeling zeer effectief is en het matig ongerief minder maakt, anderzijds worden ook experimenten uitgevoerd waarbij zenuwen worden doorgesneden, en waarbij de ziekte ernstiger kan worden.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden gedood, waarna de weefsels worden uitgenomen voor onderzoek.



4 Drie V's

4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Het project richt zich op de ingewikkelde samenhang tussen het zenuwstelsel en het afweersysteem van het lichaam. Helaas kan zo'n ingewikkelde vraagstelling alleen in een levend dier worden beantwoord. De vervolgvragen over het mechanisme van waarom zenuwstimulatie ontsteking vermindert, zullen we, waar mogelijk, ook in geïsoleerde cellen van mens en dier uitvoeren.

Dus voordat we zenuwstimulatie in mensen kunnen toepassen, is onderzoek in dieren noodzakelijk.

4.2 Vermindering

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

We beperken het aantal dieren in het experiment op basis van eerdere studies, die aangeven in hoeveel dieren een verbetering meetbaar moet zijn om te kunnen spreken van een duidelijk effect.

Verder kiezen we voor een gefaseerde aanpak van de experimenten: we bepalen eerst de meest geschikte prikkelsterkte in gezonde ratten; pas daarna testen we die in modellen voor darmontsteking. Zo verminderen we het gebruik van dieren in modellen met veel ongerief.

Daarnaast bepalen we de juiste prikkelsterkte in de modellen voor darmontsteking bij ratten, zodat we die later kunnen toepassen in modellen voor darmontsteking bij muizen, ervan uitgaande dat bij rat en muis dezelfde zenuwstimulatie zal kunnen worden gegeven.

4.3 Verfijning

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

In dit project kiezen we voor modellen van darmontsteking, omdat eerder wetenschappelijk onderzoek, en klinische testen, hebben aangetoond dat in deze ziekten zenuwstimulatie werkzaam kan zijn. De modellen voor darmontsteking zijn gekozen omdat deze modellen (rat en muis) een goed beeld geven van de manier waarop zenuwstimulatie de ontsteking remt. In de strategische opzet van de experimenten kiezen we ervoor om de electrode plaatsing en de stimulatiersterkte eerst in ratten te optimaliseren, omdat de rat een groter dier is dan de muis. De verfijnde chirurgische techniek die nodig is om de zeer kleine zenuwbundels te prikkelen kan beter niet in het kleinste dier worden ontwikkeld.

Maar het model voor darmontstekingen in muizen lijkt in sommige aspecten meer op dat van darmontstekingen in de mens. In modellen in muizen kunnen de betrokken celtypen bijvoorbeeld beter uitgezocht worden. Ook bestaan er genetisch gemodificeerde muizenstammen waarbij specifieke processen beter kunnen worden bestudeerd. Daarom is ervoor gekozen om na optimalisatie van de zenuwprikkeling in ratten, deze daarna in muismodellen te testen, waarin specifieke aspecten van darmontsteking in de mens beter kunnen worden nagebootst.

Dus om tot verfijning te komen kiezen we voor een opzet van de proeven waarbij we eerst in een rat de elektroden implanteren, en controleren welke elektrische prikkel het beste werkt. Vervolgens gaan we in darmontsteking modellen bij muizen het werkingsmechanisme verder bestuderen. Aangezien de rat groter is, vergemakkelijkt dat de implantatie en de bepaling van de juiste prikkelsterkte. Zo kunnen we sneller tot een goede

prikkel komen die ontsteking-remmend is hetgeen ook minder dieren kost.

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

Uiteraard zal pijnstilling worden toegepast waar mogelijk. We zorgen ervoor dat de ratten en muizen sociaal kunnen worden gehuisvest, door de stekker op de kop van het dier waarmee de elektroden worden aangesloten aan de apparatuur goed af te schermen, en de dieren er dus niet aan kunnen komen.

Door de dieren te huisvesten in zogenaamde IVC kooien, wordt besmetting met ongewenste bacteriën en virussen voorkomen. Daardoor zijn de experimenten beter gecontroleerd en beter te herhalen. Als gevolg daarvan zijn er minder experimenten, en dus minder dieren, nodig om de werkzaamheid van de zenuwprikkeling aan te tonen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>		Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for inflammatory bowel disease (colitis)

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

The rationale for this project is that immune cells express receptors for neurotransmitters and are functionally affected by neurotransmitters in vitro and in vivo. To achieve immunomodulation, we will intervene with neuronal activity by using cuff electrodes that can be implanted. We will test its effect on models of IBD by electrical stimulation of the vagus nerve or the sympathetic periarterial plexus that innervate the [REDACTED] or intestine.

Rationale for the experimental setup.

In this project we will address denervation and stimulation of nerve bundles. Choices for neuronal interventions will be based on the optimisation of electrode cuff devices that can be implanted around particular nerve bundles to stimulate the nerve output. The optimal stimulation to achieve a desired effect on immune cells will be determined. The effect of such stimulation will then be assessed in models of IBD.

The experimental setup of experiments is as follows:

- 1.establish an optimal stimulation protocol for the vagal, mesenteric, or [REDACTED] to reduce immune cell activation via acute stimulation experiments in anaesthetized rats.
- 2.apply this stimulation protocol in rat models of IBD to assess the reduction in the inflammatory response that causes disease to identify the nerve
- 3.establish the mechanism by which nerve stimulation affects the disease course in mouse models of IBD

The models for IBD. To study the mechanism of action of neuronal innervation affecting colitis we propose the following models.

A. two chemically induced colitis models:

1-acute and chronic Dextran Sodium Sulfate (DSS) induced colitis, used in mice and rats.

2-2,4,6-trinitro benzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis (mice).

In the DSS model, rats or mice are subjected several days to drinking water supplemented with DSS, which is directly toxic to colonic epithelial cells of the basal crypts. DSS also interacts with the mucus charge allowing luminal bacteria to directly interact with epithelia, causing an innate mediated colitis. In the TNBS model, colitis is induced by intrarectal administration of the covalently reactive reagents TNBS, induces a T-cell-mediated response against hapten-modified autologous proteins/luminal antigens.

B. a T-cell driven colitis model (mice):

3-the CD45^{rb}^{high} T cell transfer model of colitis is the most widely used model to study the initiation, induction, and regulation of immunopathology in chronic colitis that is mediated by T cells. A number of mouse models are available to assess the contribution of T cells in the pathogenesis of IBD.

Primary outcome parameters:

The mouse and rat models of colitis display variable degrees of similarity with human IBD: they lead to weight loss and wasting disease, colon inflammation, and lesions in the epithelium. Some models are more driven by innate immune cell activation in the bowel (DSS-induced colitis) and others are more dependent on delayed type hypersensitivity reactions (TNBS model) or T cells (Tcell transfer colitis models).

Clinical outcome parameters. Weight, diarrhea, colon length/weight, spleen weight, and endoscopy score are established outcome parameters of colitis.

Molecular outcome parameters for inflammation. Colitis is assessed by measuring cytokine/inflammatory mediator expression and protein release, and by scoring histological indicators for colitis in the colon. Furthermore, we have shown that the blood supply of the intestine allows a constant flow of immune cells to enter the tissue, which consists of different compartments i.e. intestinal muscularis, lamina propria and mucosa. The migration of these immune cells into the intestine is under the control of adhesion molecules (VCAM, ICAM) allowing the cells to be retained in the intestine, and of various chemokines (CXCL13, CCL19, CCL21) produced by stromal cells present in each compartment. The expression of such chemokines depends on the immune challenge, and leads to the retention of immune cells from the blood vessels in the intestine. Hence it is important to monitor expression of these molecules in our models of IBD, as immune cells and stromal cells receive neuronal information that can alter their activation status.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Optimizing the nerve stimulation rat:

Acute stimulations (stimulation of the nerve bundle under anesthesia and analyses in tissue (<4h):

1-Cuff electrode design and testing of stimulation paradigm in rat. A consortium consisting of neuroscientists, engineers (Cambridge University), CorTec corporation, and researchers in the AMC have developed specific cuff electrode probes to stimulate sympathetic and parasympathetic nerves. The intervention is as follows: Rats are placed on a proper heat mat and electrodes are positioned on the vagal nerve via an incision in the neck. The diameter of the cuff electrodes is 50-600micrometer, dependent on which nerve is to be targeted. The nerve is located and stimulated with a hook, cuff, or implanted device. The stimulator equipment can deliver for instance 200microAmp current with a frequency of 10Hz and a pulse duration of 2 ms, and delivers these signals for 15 min, 2hr, 4hr or 6hr. The rats are then sacrificed and tissue is collected for various measurements. Control animals for baseline measurements and sham stimulated animals are required to assess the effects of preparing and manipulating the nerve alone.

The effect of stimulation of the nerve bundle in the acute setting will be evaluated as follows:

-Multiple stimulation settings (frequency, amplitude, and duration of the pulse) will be applied and optimized by measurement of blood flow changes in the targeted organ, and by changes in the production of inflammatory mediators in the targeted organ and in whole blood assays performed *ex vivo* after LPS stimulation (as established earlier (Levine et al, PLOS ONE 2014; Koopman et al, PNAS 2016)). An optimized stimulation is aimed, meaning a stimulation that affects immune response parameters without affecting blood flow/perfusion through the tissue.

-we will test the response of nerve stimulation to an injected immune challenge *in vivo*, i.e. LPS by intravenous or intraperitoneal injection. Blood cytokines and other indicators of immune activation will be measured shortly thereafter.

These above described acute experiments, where nerve stimulation setting will be tested in anaesthetized rats to assess appropriate settings for stimulation, can be regarded as pilot experiments for the current chronic stimulations where implanted devices are to be used.

Implantation of electrodes for chronic stimulation in rat.

The right placement of electrodes in rats was tested previously in anesthetized rats (terminal experiments) in earlier approved DEC protocols. We are now able to locate the nerve and successfully stimulate it, and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach them to the skull. After implantation and recovery, the nerve will be stimulated daily (during DSS experiments). Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol.

Implantation of electrodes. The right placement of electrodes in rats has been tested previously in anesthetized rats (terminal experiments). We are able to locate the nerve and successfully stimulate the attached nerve and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach to the skull. We have trained ourselves for the operation in an earlier approved IVD protocol.

Experimental approach nerve denervation rat/mouse.

Alternatively, we will denervate nerves in IBD models to demonstrate the reverse effect to stimulation. Denervation will be performed on similar nerve bundles as those stimulated, but not per se similar location on the bundle, because we may be able to denervate more distal to the target organ whilst stimulation may not be possible at that location, due to anatomical difficulties to place the cuff.

Nerve denervation of the **vagus** nerve can be achieved by cutting the right celiac branch of the vagus nerve, as previously described (Costes et al. 2014). Denervation of the **spleen** and/or **colon** and **ileum** is performed by "cleaning" the mesenteric artery or [REDACTED] from the attaching nerve tissue. The effectiveness of this latter procedure as determined by Mass Spec analyses of spleen tissue is around 80% in rats and mice (earlier DEC protocols).

Selective denervation of the nerves to the [REDACTED] is performed by cutting the nerve bundle/plexus to be targeted, as previously described (Cailotto et al., 2012). Selective denervation of the nerve bundles/plexus surrounding an artery (the splenic or mesenteric artery) is performed by "cleaning" the adjacent tissue of these arteries from nerve tissue. Vagal nerve and sympathetic nerve denervations will be performed as described earlier (Oliver et al, Eur J Immunol 2016).

Rat colitis models:

DSS colitis: Once a stimulation protocol for a nerve has been optimized, we will evaluate the effects of nerve stimulation or denervation on the clinical course of colitis. The rat is the initial model of choice because of the size of the nerve bundles and because we have gained pilot experience in setting up the DSS colitis model in the rat. In pilot experiments, we have established the optimal concentration of DSS and time span over which the colitis develops in rats (7 to 9 days).

If the outcome of the experiments in rats is promising, we will apply these protocols to mouse colitis models.

Mouse colitis models:

DSS colitis: From our experience with DSS colitis in mice, we expect that the animals will show a loss in body weight after 3-4 days of exposure. The concentration of DSS and exposure time affect the inflammation in the colon. As inflammatory readout, the disease activity score (endoscopic assessment, clinical features of colitis), histological examination and pro-inflammatory cytokines expression in colonic tissues will be used. The DSS colitis will be performed in **acute** setting (7 days DSS) or in a recovery

context (5 days of lower dose of DSS, with a recovery period of up to 35 days ("**chronic model**" as in Olivier et al, European J Immunology, 2016).

Tcell transfer colitis: Transfer of FACS-sorted CD4⁺CD45RB^{high} T lymphocytes of a healthy donor mouse to an immune-incompetent SCID (of RAG-1 of -2 knock-out mouse, is a well validated model for T-cell dependent inflammatory colitis. Transfer of sorted CD4⁺ Tcell generates colitis due to the lack of regulatory Tcells in the transferred population. The mice develop colitis over a longer time course (6-9 weeks) which mimics well the human chronic course of IBD. Gene expression analyses of Tcell transfer colitis tissue and human IBD tissue was reported to show similar gene pathways indicating similarity of the immune process. This model, therefore, allows us to evaluate the function of neuronal innervation of lymphoid organs in Tcell activation, because 1) the role of Tcell activation can be studied appropriately in 2) a chronic colitis model with good resemblance to human IBD. Because 3) donor Tcell to be transferred can be derived from GGO mice, e.g. adrenergic receptor-deficient mice, the role of these (adrenergic) receptors in the disease process can be determined.

TNBS colitis: TNBS colitis is induced via intrarectal administration of TNBS, in 40% ethanol, which induces a type IV hypersensitivity reaction. The ethanol is used to trigger a transient intestinal barrier disruption to allow the TNBS to act as a hapten. The reaction triggered is a typical Th1 Tcell response seen in many IBD patients, especially as seen in patients suffering from CD.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Power calculations of all models in which the **pulse will be optimized** (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement of the primary outcome parameter of reduction of cytokine release in tissue and blood after stimulation of 40% and SD values around 30%. A quantification of secreted cytokines will be carried out in the supernatants of cultured splenocytes, tissues cells, or blood cells as primary read out for efficient stimulation. References describing this effect on which these numbers are based on are Picq et al, PLOS ONE 2013, Meregnani et al, Autonom. Neurosc. 2011, and Levine et al, PLOS ONE 2014 (the latter in a model for rheumatoid arthritis in which similar reduction of disease is seen after vagal nerve stimulation).

Power calculations of all models in which **an implanted stimulation device is used** or where denervation is performed (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement/worsening of the primary outcome parameter of histological scoring of colitis of 40%. To illustrate this, our experience with previous colitis experiments has indicated that an improvement of histological score of 40% can be regarded as significant improvement. This is for instance exemplified in published studies from our group (Snoek et al, Br J Pharmacol 2010), where neurotransmitter agonist molecules are tested in DSS and TNBS-induced colitis models. Disease Activity Index (DAI; Ten Hove et al 2010)) in these experiments is dictated by histological improvement at a score interval 0-3, was observed in experiments of n=10, with app. 30% SD values. We recently reproduced similar DAI improvements in pilot experiments in rat DSS colitis (unpublished-Willemze et al) using 10 rats per group. Similarly, we have produced a worsening of outcome by 40% in this group size of 10 upon **denervation**. Relevant references in which denervation is described are Levine YA et al, PLOS ONE 2014, where vagal nerve stimulation was tested in models of rheumatoid arthritis, and Olivier et al, Eur J Immunol, where effect of denervation was tested in chronic models of colitis, although cytokine production was not the primary outcome parameter in this study.

To determine the expected number of experimental groups to be used in each colitis model (rats or mice) will be dependent on the model used. In general, we envision experimental groups as follows (6 groups per experiment). First, a cuff implant or denervation surgery is performed, after which a minimum of 10 day recovery period is allowed. Next the following groups are assigned; 1. Mice or rats, untreated, no colitis; 2. Mice or rats, treatment; no colitis; 3. Mice or rats, no treatment, colitis (either DSS or TNBS induced, or Tcell transfer colitis); 4. Mice or rats, treatment; colitis (either specific nerve bundle stimulation or denervation); 5. intervention group 1, colitis; no treatment and 6. Intervention group 2, colitis; treatment (either specific nerve bundle stimulation or denervation). In these experiments, the power will be determined expecting a significant improvement/worsening of histological score or cytokine/mediator release.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

-numbers foreseen in pilot experiments. We will determine the optimal conditions for colitis models, given the new facility that was just reconstructed. This new facility has a new microbial status and housing conditions that influence the colitis, so we need to test our models. These pilots will be done in all colitis models mentioned (rats DSS, mouse DSS, TNBS, CD45rb transfer colitis). We expect to need 5 experimental groups in which different conditions need to be tested in groups of 10 rats/mice. In total: rat DSS: 50, mouse DSS acute: 50, DSS chronic: 50, TNBS: 50, CD45Rb transfer, 50 RAG1-/- and 50 Tcell donor mice. In total we need 50 rats and 250 mice.

Animal species, origin, age and gender.

- Next, in our optimized rat experiments with DSS colitis we will decide which sex is most responsive, in case no gender difference is seen in rat, we can use both genders.
- The rat is the initial model of choice because of its 10-fold larger size compared to mouse.
- The mouse is the animal of choice because good colitis models exist and genetically modified mice are available. In mice colitis models we will only use female mice for colitis models as male mice have been shown to display stress and fighting behaviour which affects the outcome of colitis as described earlier (see article: <https://www.ueg.eu/education/latest-news/article/article/mistakes-in-mouse-models-of-ibd-and-how-to-avoid-them/>). In the T-cell transfer model both male and female mice are used but in general, DeVoss and Diehl (DeVoss J and Diehl; Toxicol Pathol 2014; 42: 99–110) recommend using female animals if possible. They indicate that male animals are more prone to display aggressive behavior resulting in fighting, with the resulting stress and wounds potentially having a negative impact on a study. As said, this is also our own experience.
- Wild type and genetically modified mice (for instance adrenergic receptor-deficient mice (stock number 003810) are available from Jackson Laboratories.
- Mice will be used between 7 and 16 weeks of age (we aim to use young adults mice of 7-16 weeks but to obtain sufficient group sizes of e.g. SCID mice, we may have to deviate from the 7-16 weeks age group and use older mice).
- Genetically modified mice will be bred in the Animal facility of the AMC, whereas wild-type mice will be purchased from licenced companies like Charles River or Envigo, or when possible bred at AMC facilities. The proposed mouse strains/lines are already available.

Numbers of rats/mice: For rat and mouse DSS colitis experiments we expect to perform max 6 experiments per year with group sizes that need to be determined exactly, but based on historical data a group size of 10 rats and 6 experimental groups, amounting to 60 rats per experiment. Similarly, we expect to need 10 mice per group in further experiments, and a standard experiment has 6 experimental groups thus a total experiment is done with 60 mice per experiment. The project runs for 5 years but we will expected to need to do 6 experiments per year, as outlined in fig 4 in the protocol.

RAT experiments:

1. Pilot IBD: optimisation IBD model due to reconstruction mouse facility: we need 50 rats
2. Pulse optimisation: we need the following number of rats: we will optimize frequency (1), pulse duration (2) and current strength (3), and combinations thereof (4-6). Hence we anticipate to need 6*60 rats testing per nerve (splenic, SMN, vagal) so 3*360=1080 rats for optimisation. **So** total rats used for optimisation of the pulse will be max **1080**.

3. Number of rats needed for implant and experimental testing of the optimized pulse in rat IBD model.

We anticipate the testing of stimulation of the pulse in 2 groups of 60 rats =120 rats in 3 nerves is **360** rats.

Number of rats needed for denervation, once we have optimized the pulse on 3 nerves: **360**.

So total number of rats we anticipate to need: 50+1080+360+360=1850 in total

MICE experiments:

1. pilot IBD models due to reconstruction of animal facility: we need 250 mice.

2. Numbers of Mice needed in stimulation/denervation exps. As outlined in Fig 4 in the project, for 4 different models of IBD we need 4x360=1440 mice. This figure is built up as follows: per model, 3 nerves to test with an optimized pulse in groups of 60 mice: 180, 3 nerves that are denervated in groups of 60: 180; so 360 mice per model, 4 models: **4*360=1440** mice. For receptor KO models we need additional groups of 60 mice in 4 models, to be tested in 3 nerves (**720**) mice, for immune response/immune cell egress experiments we anticipate to require 360 mice as we will not test this in all models. So total mice used for experiments is 7x360mice=**2520**.

So total number of mice we anticipate to need 2520+250=2770 mice in total.

Given our staged experimental design, we may choose to use one colitis model in mice that proves to be responsive in our stimulation experiments, and we may not test the intervention in all mouse colitis models. The latter will reduce the number of mice needed for the colitis experiments.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ X Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

"Vervanging" The aim of the current project is to study the extent to which neuronal innervation can be modulated to ameliorate the inflammation. To mimic the complex interplay between cell types (neuronal cells, but also cells in the spleen, lymphoid follicles, and intestinal mucosa), we need to perform the colitis experiments in which this interplay is studied in rodents. Unfortunately, such interactions require an intact organ system, and cannot be studied in vitro.

"Verfijning" Logically, to minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the rats/mice for any sign of discomfort and mice with too much discomfort (thus reaching the humane endpoint; see at point J below) will be sacrificed. To further refine the experiments, rats/mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. The fitting of electrode connectors with an aluminium cap placed on the head allows social housing of rats as we have already established. Moreover, we will enhance the chance of successful animal experiments by first optimizing electrical probe (cuff) placement and stimulation in rat, before moving to mice, so that strictly mechanistic studies can be performed in mice in a pre-optimized setting. Another point of refinement is that optimisation of the enervation of the nerves will be performed under complete anaesthesia (rats will not recover after the experiment) before progressing to the IBD model experiments.

"Reducing" To reduce the number of mice and rats to be used, we will adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments, based on earlier studies in our group in similar models and similar interventions in the neuronal system (Snoek et al, Br J Pharmacol, 2010).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing during pre-surgical placement of the cuff or denervation. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry barrier facility of the AMC). More importantly, our staged approach allows us to assess colitis in different colitis models and we have the opportunity to choose the model that is most consistent in its effect but also has the least morbidity to the animals.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan

waarom duplicatie noodzakelijk is.

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "mucosal immunology", "sympathetic innervation", "parasympathetic innervation", "colitis" and "macrophages". Furthermore, we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

During denervation/implantation we will use analgesics pre and up to one day postoperatively.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Event	Group	discomfort	Duration
Anesthesia	all	light	Minutes
Surgery placing stimulation electrode	all	none	120 min
Denervation surgery			45 min
Recovery from anaesthesia	all	moderate	Hours but pain medication for 2 days
Colonoscopy under isoflurane (various time points during colitis; to be specified in WP-IVD)	all	moderate	3 min
Stimulation nerve	All except controls	Light	5-10 min per day in cage
Colitis induction	all	mild Moderate	Up to day 6 Up to day 35
Sacrifice	all	Terminal	Very brief

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Colitis will give an inflammation in the intestinal mucosa, which likely will cause pain as seen in patients

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

We monitor the rats and mice and will sacrifice animals as soon as humane endpoint are reached.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

To be expected humane endpoints

Both after the surgery required to implant the cuff electrodes, and after the colitis-induction, the following humane endpoints will be taken into account: Weight loss higher than 20% of starting weight, retaining diarrhea after 2 days following surgery, abnormal behavior (isolation, aberrant activity and/or mobility, clear piloerection).

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Hard to say, based on experience 5%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

- Implantation of cuff electrode and head mount → under anaesthesia → mild discomfort
- Recovery from anaesthesia → moderate discomfort
- injection Tcells → mild discomfort

- Colitis model → moderate discomfort
- Stimulation of cuff electrode, including handling → mild discomfort

Rats:

1. IBD model optimisation, n=50, discomfort moderate
2. optimisation enervation, n=1080, discomfort mild
3. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=720 of which the control group will undergo mild discomfort (n=120) and the experimental groups will undergo (maximally) moderate discomfort (n=600). Overall, 35% of rats will undergo moderate discomfort.

Mice:

1. IBD model optimisation, n=250, discomfort moderate
2. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=2520 of which the control group will undergo mild discomfort (n=420) and the experimental groups will undergo maximally moderate discomfort (n=2100), Overall 85% of mice will undergo mild discomfort.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

In addition to endoscopic and clinical parameters, it is essential to analyse different organs and tissues at the end of the experiment. For the experiments described here, several tissues will be analysed such as the primary and secondary lymph-nodes and intestines. Samples will be analysed using multiple assays (immunohistochemistry, FACS, ELISA, etc).

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice**
3. Titel van de NTS **Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for Inflammatory Bowel Disease (colitis)**
4. Type aanvraag:
 - ☒ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ☐ ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC **DEC-AMC**
 - telefoonnummer contactpersoon 
 - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken **23-02-2017**
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag
 - ☐ advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen

- Datum antwoord
- Verstrekt(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

C. Beoordeling (inhoud)

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

> Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (het onderzoeken van het effect van de neuronale innervatie van lymfoide organen [stimuleren of remmen van zenuwbanen] op de behandeling van chronische darmontstekingsziekten) en kan getypeerd worden als een project met drie subdoelen die uitkomst- en tijdsafhankelijk van elkaar zijn. De drie subdoelen dragen bij aan het bereiken van de hoofddoelstelling. De drie subdoelen zijn van elkaar afhankelijk omdat de bereikte resultaten ten behoeve van één subdoel nodig zijn voor het bereiken van de andere subdoelen. In het eerste subdoel wordt het stimuleren/denerveren van de zenuwbanen (nervus vagus, mesenterische en [REDACTED]) geoptimaliseerd in ratten zonder ziektemodel en onder anesthesie. In het tweede subdoel wordt het effect van stimulatie/denervatie van zenuwbanen op het verloop van de colitis (resp. verminderd of versterkt) onderzocht in het ratten colitis model. Voor het derde subdoel wordt onderzocht wat de onderliggende mechanismen zijn van het effect van stimuleren/denerveren van de zenuwbanen op de ziekte, in verschillende muismodellen voor colitis. Voor het onderzoeken van de mechanismen wordt overgestapt naar muizen colitis modellen omdat hierin meer mogelijkheden zijn om het mechanisme te onderzoeken. De experimentele aanpak van de verschillende subdoelen is duidelijk omschreven. Dit maakt het tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang van het project en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.
Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

> Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.

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

> De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van zenuwbanen in de immuunrespons, maar ook in relatie tot de behandeling van colitis. Dit maakt het onderzoek tegelijk fundamenteel en translationeel.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

> Het directe doel van het project is het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol die stimulatie van zenuwbanen in de immuunrespons in chronische ontstekingsziekten in de darm kan spelen. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapie (in de toekomst) voor de behandeling van de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa.

Het betreft hier zowel fundamenteel onderzoek als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel, dat niet direct binnen de grenzen van dit project valt.

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

> De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol die innervatie van zenuwbanen in de immuunrespons in chronische ontstekingsziekten kan spelen, zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, patiënten die lijden aan chronische ontstekingsziekten zoals colitis.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: de onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.

Waarden die voor colitis patiënten bevorderd worden: het ontwikkelen van een betere therapie voor deze ziekte.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt

worden door specifieke wetgeving.

> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

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

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van stimulatie/denervatie van de parasympathische zenuwbanen (nervus vagus) en met het voorgestelde ziektemodel. Ze hebben reeds implanteerbare elektrodes ("cuffs") ontwikkeld voor de sympathische zenuwbanen (van de [REDACTED]). Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven uit te kunnen voeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginselen te kunnen voldoen.

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

> De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen is logisch en goed te begrijpen. Na de technische optimalisatie van het stimuleren/denerveren van de betreffende zenuwbanen op de immuunrespons in de rat (doel 1), wordt deze kennis toegepast in een ratten colitismodel (doel 2). In deze experimenten wordt onderzocht of er een effect op de ziekte is. De onderliggende mechanismen zullen onderzocht worden in 4 verschillende colitis modellen in de muis (doel 3). Dit wordt in muizenmodellen gedaan omdat deze modellen meer mogelijkheden bieden om het onderliggende mechanisme te onderzoeken. Er worden meerdere modellen gebruikt omdat ieder model een bepaald aspect van de ziekte representeert. Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen en de DEC verwacht dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

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

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e, lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

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

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt nergens in die mate aangetast dat sprake is van verminking of ontneming van soortspecifieke eigenschappen.

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

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en het percentage dieren (5%) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring van de onderzoeksgroep realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Het bestuderen van de complexe samenhang tussen de verschillende celtypes (neuronale cellen, structurele cellen en immuuncellen) maakt het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aantallen zijn per model verschillend (rat DSS, muizen acuut en chronisch DSS, TNBS, CD45rb transfer colitis) en zullen op basis van een powerberekening gedaan worden (80% power, significantie nivo 0.05, in een pilot studie werd een SD van 30%

en een verschil van 40% gevonden en waren er 10 dieren per groep nodig om een significant verschil te verkrijgen). De aantallen die nodig zijn per proef zullen worden geschat op basis van gegevens uit eerdere experimenten. Hierdoor kan met een zo min mogelijk aantal dieren een betrouwbaar resultaat worden verkregen.

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

> De optimalisatie wordt gedaan in ratten die vanwege hun grotere formaat hiervoor geschikter zijn dan muizen. De optimalisatie wordt verricht zonder ziektemodel en worden volledig onder anesthesie uitgevoerd (de ratten komen niet meer bij na het experiment), dit verlicht het ongerief van een groot aantal proefdieren. Er wordt anesthesie toegepast tijdens en direct na de operaties in de IBD modellen. De ziektemodellen zijn uiteindelijk noodzakelijk omdat alleen op deze wijze het effect op het ziekteverloop bestudeerd kan worden. De helder en concreet geformuleerde humane eindpunten borgen de mate van verfijning.

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

> n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

> Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen worden gebruikt in het ratten colitis model. Er wordt bepaald of er een sekseverschil waarneembaar is. Indien er geen verschillen blijken te zijn, worden beide geslachten gebruikt. In de muizen colitis modellen worden alleen vrouwtjes gebruikt omdat uit de literatuur en eigen ervaring van de onderzoeker blijkt dat bij mannetjes het vechtgedrag en de daarbij komende stress invloed heeft op de ontwikkeling van de colitis. De DEC onderschrijft daarom de keuze voor uitsluitend vrouwelijke dieren in de muizen colitis modellen.

De dieren worden aangekocht bij commerciële instellingen, dan wel uit eigen fok verkregen. Het aantal in voorraad gedode dieren wordt verminderd doordat vrouwen en mannen beide gebruikt worden waar mogelijk in dit project.

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

> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.

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

> n.v.t.

NTS

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

> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in welke elektrische signalen gegeven moeten worden aan welke zenuwbanen om ontstekingen te remmen in colitis, het geringe tot matige ongerief dat de ratten en muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op inzicht in het effect van zenuwbaanprikkeling op het verloop van de immuunrespons in colitis en daarmee ook gericht is op de ontwikkeling van een verbeterde therapie voor colitis, zijn op korte termijn de proefdieren (1850 ratten en 2770 muizen) en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan colitis.

De proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat ze licht (65% van de ratten, 15% van de muizen), of maximaal matig (35% van de ratten, 85% van de muizen) ongerief zullen ondergaan. De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. Dit onderzoek kan

echter een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie, aangezien implanteerbare apparaten voor de behandeling van chronische ziekten reeds is goedgekeurd door de FDA. Echter, dit ligt in de toekomst; het zou een mogelijk gevolg kunnen zijn, en behoort niet tot het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel de 1850 ratten en de 2770 muizen licht tot matig ongerief ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC waardeert de vermeerdering van fundamentele kennis en de toepassing daarvan op korte termijn als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het geringe tot matige ongerief van de dieren staat. Het maatschappelijk belang van deze projectaanvraag is dat er meer inzicht komt in het effect van zenuwbaan prikkeling op de immuunrespons tijdens colitis. De toepassing van dit inzicht in de behandeling van colitis, zal jaren duren maar kan relatief snel verlopen omdat de zenuwbaanelektrodes al voor andere ziekten goedgekeurd zijn. Dit maatschappelijk gevolg weegt ook mee, zij het in mindere mate.

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

Het effect van het beïnvloeden van de neuronale signalering naar lymfoide organen in modellen voor colitis

De DEC is van mening dat het belang van *het verkrijgen van meer inzicht in het effect van zenuwbaanprikkeling op de immuunrespons in colitis* op korte termijn (wetenschappelijke belang) en op langere termijn, de bijdrage aan therapeutische verbeteringen voor colitis (het maatschappelijke belang), het geringe tot matige ongerief dat de 1850 ratten en 2770 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Om dit doel te bereiken worden ratten en muizen als proefdieren gebruikt. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (de experimenten voor de optimalisatie van de zenuwbaanprikkeling wordt zonder ziektemodel en geheel onder anesthesie verricht, pijnbestrijding tijdens/na operatie, veel ervaring met de operaties).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van ratten en muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen

☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

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

Het advies is in de DEC unaniem tot stand gekomen.

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

Er waren geen knelpunten of dilemma's.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD118002017842

Bijlagen

2

Datum 17 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 maart 2017. Het gaat om uw project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in ". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017842. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017842

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017842

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: laboratorium Analist
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
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

Datum:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

DEC18002017842

Over uw project

Geplande startdatum:

1 juni 2017

Geplande einddatum:

1 juni 2022

Titel project:

Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in

Titel niet-technische samenvatting:

Zenuwprikkeling als therapie tegen chronisch darmontsteking ziekten

Naam DEC:

DEC AMC

Postadres DEC:

Meibergdreef 31

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1035,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

☒ DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

17 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC Crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ AMSTERDAM


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002017842
Bijlagen
2

Datum 17 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 maart 2017
Vervaldatum: 16 april 2017
Factuurnummer: 170842
Ordernummer: Kostenplaats 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002017842	€ 1035,-

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

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 29 maart 2017 14:36
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD118002017842

Geachte [REDACTED],

Ik hoop dat u deze mail ontvangt omdat uw mailadres niet volledig is ingevuld in het aanvraagformulier.

We hebben net aan de telefoon gesproken over enkele onduidelijkheden in uw aanvraag met titel 'Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice' en nummer AVD118002017842.

De vragen waren of het acute experiment in ratten wel of niet een terminaal experiment is. Zo ja, moet het ongerief van deze dieren in de bijlage dierproeven en de NTS worden aangepast. Daarnaast wordt u verzocht de reden om alleen vrouwelijke muizen in te zetten nader te onderbouwen.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we uw antwoord graag uiterlijk maandag, 3 april 2017.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [redacted]
Verzonden: dinsdag 4 april 2017 8:57
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: aanvullende informatie AVD118002017842
Bijlagen: bijlage [redacted].doc; CCD [redacted].doc; NTS [redacted].docx

Let op, in de bijlage bij de mail van [redacted] is een macro aangetroffen. Macro's kunnen misbruikt worden om malware op uw systeem te installeren. Open de bijlage alleen als de mail afkomstig is van een door u vertrouwde afzender. Verwijder anders de mail zonder de bijlage te openen.

Dictu Servicedesk

Hieronder staat de tekst van de oorspronkelijke mail :

Beste [redacted],
ik zag dat mijn reactie nog niet was doorgekomen (via mijn lokale DEC), en stuur je hierbij nog mijn aangepaste aanvraag voor de vergadering.
Het betreft een kleine aanvulling op de punten besproken:
1-acute experimenten betreffen geen terminale experimenten, maar de dieren komen nog bij van anesthesie
2-een extra toelichting op het feit dat we alleen vrouwtjes muizen gebruiken, omdat de ziekte in elke muis in kooi op verschillende tijdstippen inzet is de kans op vechten erg groot en dat beïnvloedt de uitkomst van de proef erg.

Hopelijk komt dit nog op tijd voor de vergadering, we hadden het telefonisch al besproken.

ik heb deze reactie ook naar de lokale DEC gestuurd dus die zullen het nog wel doorsturen.

[redacted], Meibergdreef 69 1105 BK Amsterdam |
The Netherlands [redacted]

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: woensdag 29 maart 2017 14:43
Aan: [redacted]
Onderwerp: FW: aanvullende informatie AVD118002017842

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 29 maart 2017 14:36
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD118002017842

Geachte [redacted]
Ik hoop dat u deze mail ontvangt omdat uw mailadres niet volledig is ingevuld in het aanvraagformulier. We hebben net aan de telefoon gesproken over enkele onduidelijkheden in uw aanvraag met titel 'Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice' en nummer AVD118002017842.
De vragen waren of het acute experiment in ratten wel of niet een terminaal experiment is. Zo ja, moet het ongerief van deze dieren in de bijlage dierproeven en de NTS worden aangepast. Daarnaast wordt u verzocht de reden om alleen vrouwelijke muizen in te zetten nader te onderbouwen.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we uw antwoord graag uiterlijk maandag, 3 april 2017.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

■■■■■■■■■■
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

AMC Disclaimer : <https://www.amc.nl/disclaimer>



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | <u>11800</u> |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | <u>Academic Medical Center</u> |
| 1.3 | Vul de titel van het project in. | <u>Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice</u> |

2 Categorie van het project

- | | | |
|-----|--|---|
| 2.1 | In welke categorie valt het project.

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.
-

This project concerns fundamental and applied research questions.

The central hypothesis of this study is that intervening with neuronal innervation of lymphoid organs affects immune responses that are important in chronic inflammatory diseases (termed Immune-Mediated Inflammatory Diseases (IMIDs)). These responses include events such as lymphocyte trafficking and immune cell activation through pattern recognition receptors.

General goals of the research are to test and validate neuronal intervention techniques (i.e. denervation and stimulation) to treat chronic inflammatory diseases, such as Inflammatory Bowel Disease (IBD, or colitis, but we will refer to IBD for clarity throughout this text).

Rationale for this project:

Modulation of vagus nerve activity by stimulating the vagal nerve at cervical or subdiaphragmatic level has been demonstrated to affect immune responses in vivo: stimulation reduced systemic and local inflammation (Borovikova et al, Nature 2001; deJonge et al, Nat Immunol 2005), whereas denervation augments inflammation (Oliver et al, Eur J Immunol 2016). The mechanism underlying neuro-immune modulation is unclear and it is believed that a better understanding will allow novel treatment of IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Nerve activity can affect immune responses because of the neurotransmitter receptors that are expressed on immune cells. As lymphoid organs are intensely innervated by particularly sympathetic fibers, nerve stimulation can have broad immune modulating effects relevant for IBD pathogenesis, even without the need for direct innervation of inflamed tissue. Neurotransmitter receptor activation affects multiple immune cell functions, such as cell trafficking to lymphoid organs (Kanai et al, J Exp Med 2015), cytokine production, and pathogen phagocytosis and killing. All of these are relevant for IBD pathogenesis. Clinical trials of nerve stimulation to reduce inflammation are already underway (Bonaz et al, Neurogastro Mot 2016) and are well received among patients (Zitnik, Ann Rheum Dis. 2011), underscoring the safety, feasibility and societal urgency of nerve stimulation using implantable devices to reduce inflammatory responses, i.e. the topic of this project.

For this project we choose IBD as an immune mediated disease for the reason that: 1) IBD is a relatively prevalent diseases for which a great unmet need for treatment exists, 2) clinical trials of vagal nerve stimulation have already been performed in IBD (clinical trial NCT02311660), (and rheumatoid arthritis; clinical trial NCT01552941) and show efficacy in ameliorating disease likely via reduction of macrophage TNF release (neutralizing TNF using anti-TNF is an end point therapy for these patients), 3) well established rat and mouse models for IBD exist. The latter supports the societal significance and potential clinical application of the proposed project.

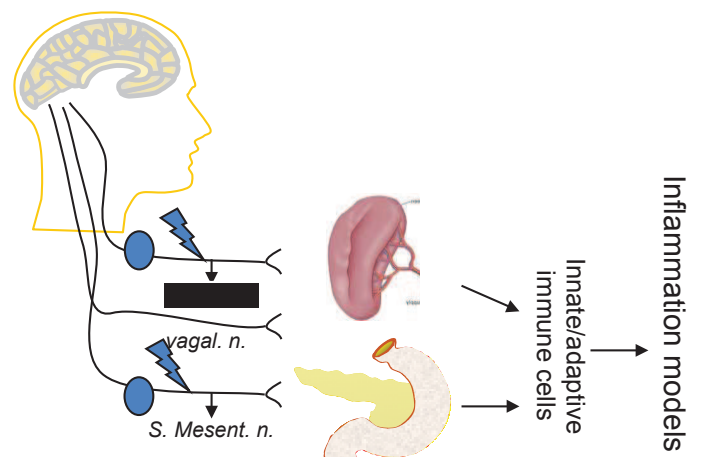
Our previous work in this area (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013) and that of others (Martelli et al, J Physiol 2014) led us to assume that not only the vagal (parasympathetic) nerve, but also nerves of the sympathetic system are able to mediate immune modulation. In particular, nerves projecting to the [redacted] or [redacted] organs (Kanai et al, J Exp Med 2014) may mediate the modulation of the immune response by the vagus nerve. This was concluded from studies where [redacted] (removal of the

██████) abolishes the effect of vagal nerve stimulation (Ji et al, Muc Immunol 2014). Moreover, sympathetic neurotransmitters are more immune-modulatory than parasympathetic neurotransmitters (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013). These data suggest that vagal nerve stimulation indirectly stimulates ██████ innervation (indirectly, because no direct connection in the coeliac plexus between vagus nerve and ██████ innervation was ever demonstrated (Martelli et al, Exp Physiol 2016), although vagal fibers may reach the ██████ (Buijs et al, PLOS ONE 2008). Irrespective, vagus nerve stimulation has very pleiotropic effects because of the many organs innervated by the vagal nerve. This project's aim is to show that direct stimulation of sympathetic nerve bundles to the ██████, or to the intestine, is a more effective approach than vagus nerve stimulation.

Nerve fibers to the ██████ are organized around the splenic artery, in a plexus around the artery. We will refer to this plexus as the ██████. Similar to ██████ stimulation, stimulating the output of the sympathetic innervation of the intestine, including intestinal lymphoid tissue via the **mesenteric nerve plexus** that surrounds the mesenteric artery, may be effective in the treatment of IBD. Sympathetic nerves that innervate immune cells in intestinal lymphoid tissue and mucosa can probably reduce IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Notably, the spleen and mesenteric lymphoid organs jointly mediate immune activation in IBD. See for a schematic illustration of neural routes Fig 1.

Because the neuro-modulatory intervention appears to be relevant for the therapy of IBD, we have designed nerve "cuffs" (devices that enclose the nerve to allow electrical activation of the nerve fibers) that can be implanted (see Fig 2 for an illustration of the cuffs). Such cuffs can also be used to stimulate the nerve plexus and include the artery that is attached to it, as described above. Our industrial partner GlaxoSmithKline Bioelectronics (now Galvani Bioelectronics) has the intention to bring such devices to the market for treatment and, therefore, supports this research.

Fig. 1. The proposed experimental setup. Specific nerves will be denervated or stimulated to affect chronic inflammatory disease.



The choice for rat and mouse experiments.

We have developed nerve cuffs to fit on the mesenteric, vagal, and splenic nerves over the past years. Because these initial nerve cuffs were relatively large and required a direct connection with external impulse generators, we used rats to implant the cuffs and test their ability to reduce IBD. In these experiments, chronically implanted electrodes were attached to adaptors that were cemented on the head of the rat to allow daily stimulation without the need for anesthesia. These implanted devices delivered proper pulses to the targeted nerve for over 21 days. The nature of electrical stimulation of the nerve bundle (i.e. the settings of the impulse generator) is important for the response to optimize the ratio of the desired (anti-inflammatory) and unwanted effects (e.g. altered perfusion of the organ). Because of our experience with the rat IBD model, stimulation parameters such as impulse frequency (1-20 Hz), applied current (10-200 μ A), and pulse duration (10-1000 μ sec) can be optimized without the need for first adapting the system to the experimental animal (a mouse is 10x smaller than a rat).

Rat models for IBD are less well developed. In contrast, various mouse models for IBD are available to better study aspects of IBD that are relevant to human IBD (a discussion of rats and mice as experimental models for IBD can be found in te Velde et al (IBD 2007) and Zeeff et al (IBD 2016)). Furthermore, mouse models offer additionally the availability of genetically modified strains that allow intervention with the expression of specific genes (e.g. neurotransmitters and their receptors) and the

tracing of cells. Moreover, more reagents for analyses, such as antibodies for complex FACS sorting panels, are available for mice. These complex FACS sorting experiments are necessary to identify which cells respond to nerve stimulation in the targeted organ. We, therefore, plan to switch to mouse models for IBD once we have characterized the electrical settings and responses of the implanted cuffs in rats.

Summarizing, we aim to:

- 1) Optimize the implantation and stimulation protocol for nerve bundles (splenic, mesenteric, and vagus nerves) in rat, extending earlier work;
- 2) Test the proof-of-concept of the efficacy of nerve bundle stimulation to reduce disease in rat models of IBD;
- 3) Implement the use of smaller, more appropriate, cuffs in mouse models of IBD that will allow us to better understand the mode of action and thus improve their efficacy by targeting the specific mechanisms that are responsible for the effects. Such implementation also requires smaller head mounts, with which we have already experience via working with our industry partner in this project.

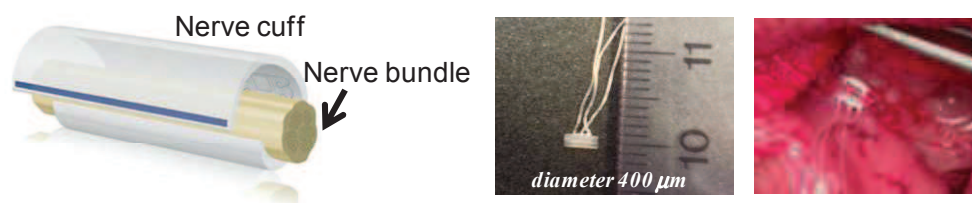


Fig 2. The implanted cuff electrode that will be used for this research. Left panel: nerve cuff, middle panel: illustration of the cuff and its size. Size ranges of 100-500 micrometer will be used depending on nerve diameter. Right panel: illustration of a nerve cuff (prototype) that we plan to use to electrically stimulate a nerve bundle (or plexus) (example: the splenic nerve plexus around the splenic artery).

Rat IBD models. We have experience with IBD models in rats and mice. In rats, we will use the DSS (Dextran Sulphate Sodium)-induced IBD model. In this model DSS is administered via the drinking water and causes damage to the epithelial layer of the colon that, in turn, causes an innate immune cell-driven response in the underlying mucosa leading to IBD.

Mouse IBD models. In contrast to the rat model, mouse models for IBD, including acute and chronic DSS-induced colitis, 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis (TNBS is a hapten that causes a T-cell-driven colitis), and CD45Rb^{high} transfer colitis (transfer of pathogenic T-cells to an immune-compromised host) allow molecular analyses of the immune responses.

Why testing of different mouse models for IBD? The etiology for human IBD (Ulcerative colitis nor Crohn's Disease) is not clear. Maybe for that reason, no specific model human IBD exists. However, the different rat/mouse models described in this project allow us to study different aspects of human IBD, for instance the DSS model is driven by innate pathways, the Tcell transfer model reflects a T cell driven IBD. Such multiple analyses allow modeling of clinically relevant aspects of human IBD, such as the involvement of innate and adaptive immune cells, ulcer and wound healing, barrier function, and involvement of cytokines such as TNF. The combination of mouse models of colitis is, therefore, well suited to study the mechanisms by which neuronal stimulation affects colitis.

It is important to note that these models are very dependent on the microbial status of the animal facility. As the AMC animal facility is just reconstructed and will be re-colonized from mice lines re-derived from other breeders, we need to optimize the conditions for the colitis models. This holds for the acute and chronic DSS-induced colitis, TNBS- induced colitis, and CD45rbhigh induced colitis.

Denervation and stimulation of nerve bundles in IBD models. Specific cuff electrodes to stimulate vagus nerve, and the splenic and mesenteric plexus in the rat will be used (Fig 2). Nerve activity will be blocked via surgical denervation. Stimulation and denervation of nerves is anticipated to ameliorate and augment inflammation, respectively, because of the anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation in septic models. However, amelioration of inflammatory disease by nerve activation is not always evident; inflammation involves many actors beyond cytokines, and it will also be relevant to reduce

neuronal activity to achieve modulation of the course of disease, such as shown for modulation of inflammation via the carotid body, which requires inhibition of nerve activity (Sacramento et al, 2016). So the combination of nerve denervation/stimulation will allow a full understanding of the modulation of the inflammatory process, and therefore we include stimulation and denervation experiments in this project. In addition, stimulation of different nerve bundles innervating lymphoid organs, i.e. those in the gut or [REDACTED], or stimulation of the vagus nerve, may be effective in reducing IBD because a general intervention in the immune response is anticipated.

Optimization of the electrical stimulation in disease models. The protocol for electrical stimulation of the nerve bundle needs to be optimized for current, voltage, and pulse duration and frequency. In particular, we need to quantify and optimize the electrical signal delivered to the nerve bundle in its efficacy to affect immune cell activation, such as [REDACTED]. Therefore the strategy of this project is to optimize the surgery, pulse choice etc in a rat model, before moving on to mouse models, as outlined in Fig 3.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

The central research question is whether intervention with the function of (para)sympathetic nerve bundles can affect the course and pathogenesis of IBD.

Specific research questions:

1. What is the efficacy of selective stimulation of vagal nerve bundle (parasympathetic), mesenteric plexus (sympathetic), or [REDACTED] [REDACTED] (sympathetic) on the course of IBD. We will use nerve denervation by surgical techniques to show the opposite effect of nerve stimulation.
2. What is the mechanism of action of the intervention (experiments in mouse models of IBD).

Feasibility of the studies.

Given our prior work and experience with the surgery, the proposed work is feasible within the 5 years timeline. Although many mechanistic questions around neural immunomodulation remain to be answered even following this project, proof of principle of nerve stimulation/denervation to modulate inflammation can be provided in the project time. It should be noted that strict mechanistic experiments, such as neurotransmitter receptor functions and [REDACTED], can be subsequently addressed in in vitro experiments.

The team (2 FTE lab technicians and 2 postdocs) is well trained in animal surgery. GSK Bioelectronics will take care of the nerve cuffs and stimulators.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Societal interest: Chronic disabling conditions associated with IBD adversely affect patients in terms of physical suffering and pain, impaired function, and diminished quality of life. These persistent relapsing diseases have a significant influence on individual employment status and work-related productivity. In addition, IBD represents a sizable burden on society due to high healthcare and non-healthcare related costs. IBD, which comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), affects about 0.1% of the Western population. IBD affects youth at their prime of life, causing diarrhea, intestinal bleeding, and severe gut discomfort.

So-called biologicals (e.g. monoclonal antibodies and recombinant proteins directed against pro-inflammatory cytokines (like infliximab), or anti-integrin (vedoluzimab) have been demonstrated as very effective. However, none of the novel therapies has induced a lasting remission. Hence, IBD treatment represents a large unmet clinical need.

Scientific interest: It is only recently that we begin to appreciate the role of innervation of lymphoid organs, such as spleen and lymphoid follicles in the gut. This project wants to explore the possibilities of the neuronal routes to intervene with inflammatory processes, with a focus on IBD. We have already shown that denervation affects the course of intestinal inflammation. The clinical potential of employing neuronal signaling to restore immune balance in the gut is evidenced by the success of ongoing clinical trials of vagal nerve stimulation (VNS) in rheumatoid arthritis (Koopman FA et al, PNAS 2016), and IBD (Bonaz et al, J Physiol 2016). However, the VNS is not only invasive, but also crude (it stimulates the large cervical portion of the vagus that contains both efferent and afferent cholinergic and adrenergic nerves projecting the entire body), and is not based on an appropriate mechanistic concept of action to allow improvement. For instance we showed that the immune cells in colonic mucosa (in IBD) are not directly innervated by the vagus nerve (Cailotto et al, Neurogastro and Mot 2011), so any clinical effect sorted by VNS is by definition indirect. This lack of understanding of the neuronal effector pathways and targeted immune cells hampers further improvement of efficacy of the treatment.

This project will address this issue by stimulating the nerves at a site more distal to the (immune)organ such as [REDACTED] and intestinal gut-associated lymphoid tissue, rather than the crude cervical vagal nerve stimulation tested thus far. This with the aim to reduce immune cell activation relevant in IBD. Denervation and stimulation experiments will establish proof of concept for nerve intervention to affect disease course in IBD models. Transcriptional and cellular analyses of immune cells in the targeted tissue will allow titration of the signal. Preclinical analyses are geared towards human spleen innervation. The aim of those studies is to test a prototype for human [REDACTED] stimulation in a pilot IBD patient population. In this project, GSK Bioelectronics and AMC collaborate closely, which will leverage the development of an effective device for use in human IMIDs greatly.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

General strategy of experiments;

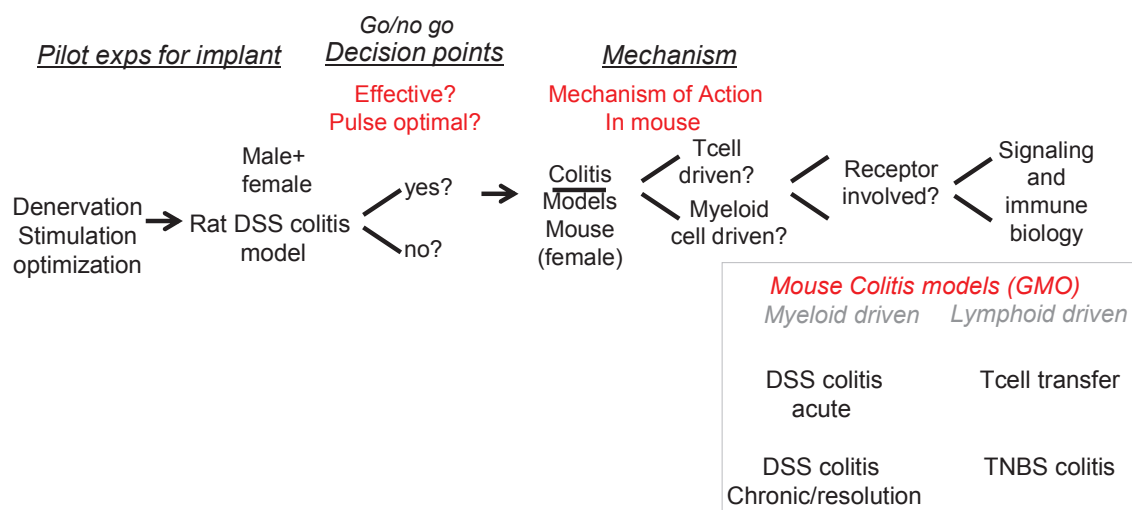


Fig. 3. Strategy of research, including indications of go/noGo points. First, pilot experiments in rat will allow us to pinpoint intervention points in three different nerve bundles (vagal nerve, mesenteric nerve, splenic nerve). Experiments will be performed to optimize implantation, denervation, and optimal stimulation parameters in acute stimulation experiments in rat. Next we will test efficacy of stimulation in IBD models in rats. In mouse IBD models, female mice are described to be the gender of choice. If stimulation is effective on reducing IBD, the next will be to move to (GMO) mouse models of myeloid- or lymphoid-driven IBD to determine the mechanism of action.

Key objectives and decision points:

- 1- to establish an optimal stimulation protocol for a nerve-bundle or plexus to reduce immune cell activation (by means of stimulation of vagal, mesenteric, or splenic nerve)
- 2- to apply this stimulation in models of IBD in rat to evaluate the inflammatory response that causes disease and to decide on the stimulus given in mouse models in objective 3
- 3- to decipher the mechanism by which stimulation acts on the disease course in mouse models of IBD

Ad 1- optimization of the parameters and surgery of the stimulus given. The stimulation paradigm will be varied (1-frequency, 2-current strength, 3-pulse duration, and other potential parameters that can be determinants in the effective immune-modulation). Optimal stimulation will be determined according to blood flow changes in targeted tissue, as well as measurement of neurotransmitter release, and local cytokine release measurements.

Specific procedures to optimize the parameters of electrical stimulation.

In earlier studies in human, effects of vagal nerve stimulations on the immune response were measured by determining cytokine secretion in blood cells ex vivo stimulated with LPS (Koopman FA et al, PNAS 2016)). Similarly, we will optimize the effects of nerve stimulation on 1) cytokine release in ex vivo stimulated cells from different organs, and 2) acutely after stimulation in vivo. To do the latter, the animal will be injected intraperitoneally with an immune challenge (LPS or other immune stimulator) after a nerve bundle was stimulated (under anesthesia), and immune cells will be collected from peripheral blood or lavage fluid and immune response measured. We aim here to determine the optimal electrical stimulation parameters that affect immune responses relevant to IBD.

Control animals for baseline measurements and sham-stimulated animals are required to ensure that preparing and "cuffing" the nerve alone does not give the same/more/less neurotransmitter release.

Go/no Go: not applicable, the optimal stimulation will be used.

Ad 2- Chronic stimulations of (para)sympathetic nerves using implanted devices. In previous research we have constructed effective cuff electrodes for use in **rat**. For instance, we have adapted these electrodes to fit the superior mesenteric nerve bundles. A similar strategy will be applied for other nerve bundles, such as ████████ and vagal nerves. Gender of Rat/mice; earlier data in mouse colitis models demonstrate a more reproducible outcome in female mice (for reasons outlined in Bijlage), favoring the use of female mice in colitis experiments (fig 4). Generation of disease symptoms will cause fighting behavior and additional stress factors in male mice, compared to female, which will directly affect the outcome of these experiments. We will use both male/female in rat IBD experiments.

Nerve stimulation in inflammation models: After implantation and recovery stimulation will be performed daily in IBD models for specific time intervals. Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol. Details are in the bijlage.

Nerve denervation experiments. We aim to apply selective nerve denervation surgery and assess the effect of specific immune processes mediating IBD. Details are in the bijlage.

Go/no GO decision points: effective reduction of disease in rat IBD. Lack of effect of either nerve stimulation in rat models will be a no-go point to carry out experiments in mice. The ineffective reduction of IBD symptoms in rat models after stimulating a specific nerve will be a no-go for experiments in 3.

Ad 3. Mouse models of colitis. These will be carried out based on the findings on gender (favoring female as in point 2), stimulation, and nerve(s) determined in 2.

Go/no Go decision points: not applicable in this stage, we will use the stimulation, type of nerve, and gender as deduced from 2

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

The strategy of experiment (see also Fig 3). As outlined above, our strategy is to first establish the surgical method and parameters for stimulation in rats because of their size. These experiments will determine gender, type of nerve, and stimulation parameters to be used.

As mouse models for IBD provide better tools to gain insight into the mechanism of action (reviewed in te Velde et al, IBD 2017), we plan to analyze the working mechanisms in mice.

If the (chronic) implantations in rats are successful, implanted cuff electrode and denervation techniques will be adapted to mice to deduce the mechanism of action of efficacious stimulation/denervation protocols.

In general, we have chosen for a staged format of experimentation, **first** optimizing the implantation studies, nerve bundles, and stimulation protocols, **next** determining efficacy in proof of concept experiments in rat, and **third**, to transfer such implanted devices to mice to determine their mechanism of action.

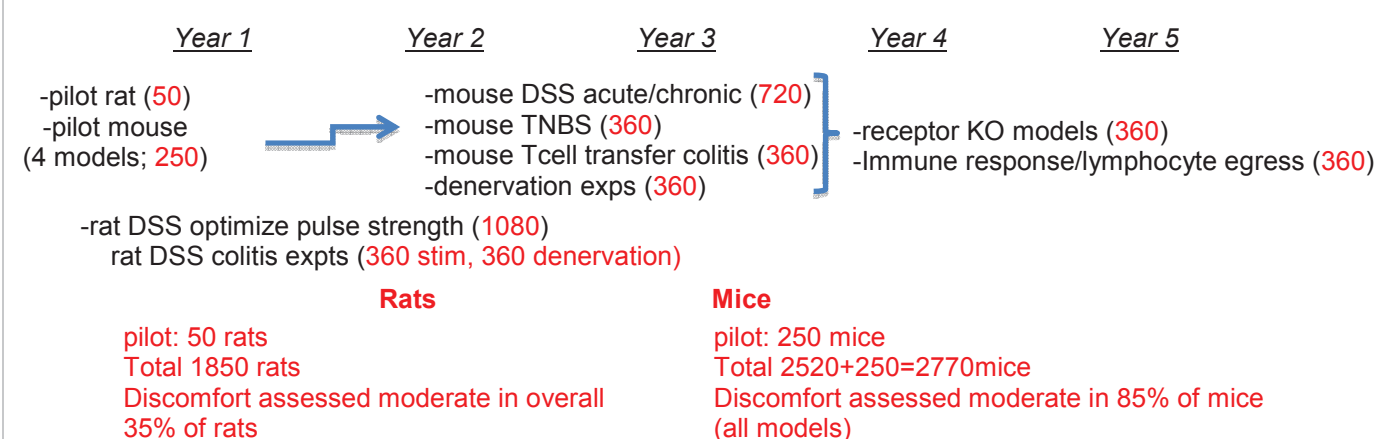


Fig 4. Strategy of experimentation and estimated number of rats and mice used, including assessment of the percentage of those animals suffering discomfort (in red). Numbers mentioned include a pilot phase of experimentation (in red indicated) where we need to establish the IBD models in our new animal facility. For calculation of number of mice/rats and experimental groups please refer to the bijlage.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Research strategy: See also figure 3.

1-Optimization. Nerve stimulation and denervation protocols will be tested in rats, since we have most experience with this model. Using rats instead of mice will avoid a learning curve, which would affect the optimization of the protocol.

2-Proof of efficacy. For the same reasons as stated under 1), we will establish the efficacy of nerve stimulation and denervation protocols in rat models of IBD.

3-Mechanism of action. The availability of rat models of IBD are restricted to DSS. Once we have optimized the protocols, we will therefore turn to mouse models of colitis that are better to tease out mechanism of action.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	intervening with neuronal signaling in rat and mouse experimental IBD
2	
3	
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>		Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for inflammatory bowel disease (colitis)

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

The rationale for this project is that immune cells express receptors for neurotransmitters and are functionally affected by neurotransmitters in vitro and in vivo. To achieve immunomodulation, we will intervene with neuronal activity by using cuff electrodes that can be implanted. We will test its effect on models of IBD by electrical stimulation of the vagus nerve or the sympathetic periarterial plexus that innervate the [REDACTED] or intestine.

Rationale for the experimental setup.

In this project we will address denervation and stimulation of nerve bundles. Choices for neuronal interventions will be based on the optimisation of electrode cuff devices that can be implanted around particular nerve bundles to stimulate the nerve output. The optimal stimulation to achieve a desired effect on immune cells will be determined. The effect of such stimulation will then be assessed in models of IBD.

The experimental setup of experiments is as follows:

1. establish an optimal stimulation protocol for the vagal, mesenteric, or [REDACTED] to reduce immune cell activation via acute stimulation experiments in anaesthetized rats.
2. apply this stimulation protocol in rat models of IBD to assess the reduction in the inflammatory response that causes disease to identify the nerve
3. establish the mechanism by which nerve stimulation affects the disease course in mouse models of IBD

The models for IBD. To study the mechanism of action of neuronal innervation affecting colitis we propose the following models.

A. two chemically induced colitis models:

1-acute and chronic Dextran Sodium Sulfate (DSS) induced colitis, used in mice and rats.

2-2,4,6-trinitro benzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis (mice).

In the DSS model, rats or mice are subjected several days to drinking water supplemented with DSS, which is directly toxic to colonic epithelial cells of the basal crypts. DSS also interacts with the mucus charge allowing luminal bacteria to directly interact with epithelia, causing an innate mediated colitis. In the TNBS model, colitis is induced by intrarectal administration of the covalently reactive reagents TNBS, induces a T-cell-mediated response against hapten-modified autologous proteins/luminal antigens.

B. a T-cell driven colitis model (mice):

3-the CD45^{rb}^{high} T cell transfer model of colitis is the most widely used model to study the initiation, induction, and regulation of immunopathology in chronic colitis that is mediated by T cells. A number of mouse models are available to assess the contribution of T cells in the pathogenesis of IBD.

Primary outcome parameters:

The mouse and rat models of colitis display variable degrees of similarity with human IBD: they lead to weight loss and wasting disease, colon inflammation, and lesions in the epithelium. Some models are more driven by innate immune cell activation in the bowel (DSS-induced colitis) and others are more dependent on delayed type hypersensitivity reactions (TNBS model) or T cells (Tcell transfer colitis models).

Clinical outcome parameters. Weight, diarrhea, colon length/weight, spleen weight, and endoscopy score are established outcome parameters of colitis.

Molecular outcome parameters for inflammation. Colitis is assessed by measuring cytokine/inflammatory mediator expression and protein release, and by scoring histological indicators for colitis in the colon. Furthermore, we have shown that the blood supply of the intestine allows a constant flow of immune cells to enter the tissue, which consists of different compartments i.e. intestinal muscularis, lamina propria and mucosa. The migration of these immune cells into the intestine is under the control of adhesion molecules (VCAM, ICAM) allowing the cells to be retained in the intestine, and of various chemokines (CXCL13, CCL19, CCL21) produced by stromal cells present in each compartment. The expression of such chemokines depends on the immune challenge, and leads to the retention of immune cells from the blood vessels in the intestine. Hence it is important to monitor expression of these molecules in our models of IBD, as immune cells and stromal cells receive neuronal information that can alter their activation status.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Optimizing the nerve stimulation rat:

Acute stimulations (stimulation of the nerve bundle under anesthesia and analyses in tissue thereafter (<6h):

1-Cuff electrode design and testing of stimulation paradigm in rat. A consortium consisting of neuroscientists, engineers (Cambridge University), CorTec corporation, and researchers in the AMC have developed specific cuff electrode probes to stimulate sympathetic and parasympathetic nerves. The intervention is as follows: Rats are placed on a proper heat mat and electrodes are positioned on the vagal nerve via an incision in the neck. The diameter of the cuff electrodes is 50-600micrometer, dependent on which nerve is to be targeted. The nerve is located and stimulated with a hook, cuff, or implanted device. The stimulator equipment can deliver for instance 200microAmp current with a frequency of 10Hz and a pulse duration of 2 ms, and delivers these signals for 15 min, 2hr, 4hr or 6hr. The rats are then sacrificed at the time point chosen within 6 hrs after pulse delivery (the animals recover from anesthesia for surgery), and tissue is collected for various measurements. Control animals for baseline measurements and sham stimulated animals are required to assess the effects of preparing and manipulating the nerve alone.

The effect of stimulation of the nerve bundle in the acute setting will be evaluated as follows:

-Multiple stimulation settings (frequency, amplitude, and duration of the pulse) will be applied and optimized by measurement of blood flow changes in the targeted organ, and by changes in the production of inflammatory mediators in the targeted organ and in whole blood assays performed *ex vivo* after LPS stimulation (as established earlier (Levine et al, PLOS ONE 2014; Koopman et al, PNAS 2016)). An optimized stimulation is aimed, meaning a stimulation that affects immune response parameters without affecting blood flow/perfusion through the tissue.

-We will test the response of nerve stimulation to an injected immune challenge *in vivo*, i.e. LPS by intravenous or intraperitoneal injection. Blood cytokines and other indicators of immune activation will be measured shortly thereafter.

These above described acute experiments, where nerve stimulation setting will be tested in anaesthetized rats to assess appropriate settings for stimulation, can be regarded as pilot experiments for the current chronic stimulations where implanted devices are to be used.

Implantation of electrodes for chronic stimulation in rat.

The right placement of electrodes in rats was tested previously in anesthetized rats (terminal experiments) in earlier approved DEC protocols. We are now able to locate the nerve and successfully stimulate it, and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach them to the skull. After implantation and recovery, the nerve will be stimulated daily (during DSS experiments). Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol.

Implantation of electrodes. The right placement of electrodes in rats has been tested previously in anesthetized rats (terminal experiments). We are able to locate the nerve and successfully stimulate the attached nerve and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach to the skull. We have trained ourselves for the operation in an earlier approved IVD protocol.

Experimental approach nerve denervation rat/mouse.

Alternatively, we will denervate nerves in IBD models to demonstrate the reverse effect to stimulation. Denervation will be performed on similar nerve bundles as those stimulated, but not per se similar location on the bundle, because we may be able to denervate more distal to the target organ whilst stimulation may not be possible at that location, due to anatomical difficulties to place the cuff.

Nerve denervation of the **vagus** nerve can be achieved by cutting the right celiac branch of the vagus nerve, as previously described (Costes et al. 2014). Denervation of the **pancreas** and/or **colon** and **ileum** is performed by "cleaning" the mesenteric artery or splenic artery from the attaching nerve tissue. The effectiveness of this latter procedure as determined by Mass Spec analyses of spleen tissue is around 80% in rats and mice (earlier DEC protocols).

Selective denervation of the nerves to the **pancreas**/small intestine/lymph node/colon is performed by cutting the nerve bundle/plexus to be targeted, as previously described (Cailotto et al., 2012). Selective denervation of the nerve bundles/plexus surrounding an artery (the **pancreas** or mesenteric artery) is performed by "cleaning" the adjacent tissue of these arteries from nerve tissue. Vagal nerve and sympathetic nerve denervations will be performed as described earlier (Oliver et al, Eur J Immunol 2016).

Rat colitis models:

DSS colitis: Once a stimulation protocol for a nerve has been optimized, we will evaluate the effects of nerve stimulation or denervation on the clinical course of colitis. The rat is the initial model of choice because of the size of the nerve bundles and because we have gained pilot experience in setting up the DSS colitis model in the rat. In pilot experiments, we have established the optimal concentration of DSS and time span over which the colitis develops in rats (7 to 9 days).

If the outcome of the experiments in rats is promising, we will apply these protocols to mouse colitis models.

Mouse colitis models:

DSS colitis: From our experience with DSS colitis in mice, we expect that the animals will show a loss in body weight after 3-4 days of exposure. The concentration of DSS and exposure time affect the inflammation in the colon. As inflammatory readout, the disease activity score (endoscopic assessment, clinical features of colitis), histological examination and pro-inflammatory cytokines expression in colonic

tissues will be used. The DSS colitis will be performed in **acute** setting (7 days DSS) or in a recovery context (5 days of lower dose of DSS, with a recovery period of up to 35 days ("**chronic model**" as in Olivier et al, European J Immunology, 2016).

Tcell transfer colitis: Transfer of FACS-sorted CD4⁺CD45RB^{high} T lymphocytes of a healthy donor mouse to an immune-incompetent SCID (of RAG-1 of -2 knock-out mouse, is a well validated model for T-cell dependent inflammatory colitis. Transfer of sorted CD4⁺ Tcell generates colitis due to the lack of regulatory Tcells in the transferred population. The mice develop colitis over a longer time course (6-9 weeks) which mimics well the human chronic course of IBD. Gene expression analyses of Tcell transfer colitis tissue and human IBD tissue was reported to show similar gene pathways indicating similarity of the immune process. This model, therefore, allows us to evaluate the function of neuronal innervation of lymphoid organs in Tcell activation, because 1) the role of Tcell activation can be studied appropriately in 2) a chronic colitis model with good resemblance to human IBD. Because 3) donor Tcell to be transferred can be derived from GGO mice, e.g. adrenergic receptor-deficient mice, the role of these (adrenergic) receptors in the disease process can be determined.

TNBS colitis: TNBS colitis is induced via intrarectal administration of TNBS, in 40% ethanol, which induces a type IV hypersensitivity reaction. The ethanol is used to trigger a transient intestinal barrier disruption to allow the TNBS to act as a hapten. The reaction triggered is a typical Th1 Tcell response seen in many IBD patients, especially as seen in patients suffering from CD.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Power calculations of all models in which the **pulse will be optimized** (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement of the primary outcome parameter of reduction of cytokine release in tissue and blood after stimulation of 40% and SD values around 30%. A quantification of secreted cytokines will be carried out in the supernatants of cultured splenocytes, tissues cells, or blood cells as primary read out for efficient stimulation. References describing this effect on which these numbers are based on are Picq et al, PLOS ONE 2013, Meregnani et al, Autonom. Neurosc. 2011, and Levine et al, PLOS ONE 2014 (the latter in a model for rheumatoid arthritis in which similar reduction of disease is seen after vagal nerve stimulation).

Power calculations of all models in which **an implanted stimulation device is used** or where denervation is performed (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement/worsening of the primary outcome parameter of histological scoring of colitis of 40%. To illustrate this, our experience with previous colitis experiments has indicated that an improvement of histological score of 40% can be regarded as significant improvement. This is for instance exemplified in published studies from our group (Snoek et al, Br J Pharmacol 2010), where neurotransmitter agonist molecules are tested in DSS and TNBS-induced colitis models. Disease Activity Index (DAI; Ten Hove et al 2010)) in these experiments is dictated by histological improvement at a score interval 0-3, was observed in experiments of n=10, with app. 30% SD values. We recently reproduced similar DAI improvements in pilot experiments in rat DSS colitis (unpublished-Willemze et al) using 10 rats per group. Similarly, we have produced a worsening of outcome by 40% in this group size of 10 upon **denervation**. Relevant references in which denervation is described are Levine YA et al, PLOS ONE 2014, where vagal nerve stimulation was tested in models of rheumatoid arthritis, and Olivier et al, Eur J Immunol, where effect of denervation was tested in chronic models of colitis, although cytokine production was not the primary outcome parameter in this study.

To determine the expected number of experimental groups to be used in each colitis model (rats or mice) will be dependent on the model used. In general, we envision experimental groups as follows (6 groups per experiment). First, a cuff implant or denervation surgery is performed, after which a minimum of 10 day recovery period is allowed. Next the following groups are assigned; 1. Mice or rats, untreated, no colitis; 2. Mice or rats, treatment; no colitis; 3. Mice or rats, no treatment, colitis (either DSS or TNBS induced, or Tcell transfer colitis); 4. Mice or rats, treatment; colitis (either specific nerve bundle stimulation or denervation); 5. intervention group 1, colitis; no treatment and 6. Intervention group 2, colitis; treatment (either specific nerve bundle stimulation or denervation). In these experiments, the power will be determined expecting a significant improvement/worsening of histological score or cytokine/mediator release.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

-numbers foreseen in pilot experiments. We will determine the optimal conditions for colitis models, given the new facility that was just reconstructed. This new facility has a new microbial status and housing conditions that influence the colitis, so we need to test our models. These pilots will be done in all colitis models mentioned (rats DSS, mouse DSS, TNBS, CD45rb transfer colitis). We expect to need 5 experimental groups in which different conditions need to be tested in groups of 10 rats/mice. In total: rat DSS: 50, mouse DSS acute: 50, DSS chronic: 50, TNBS: 50, CD45Rb transfer, 50 RAG1-/- and 50 Tcell donor mice. In total we need 50 rats and 250 mice.

Animal species, origin, age and gender.

- Next, in our optimized rat experiments with DSS colitis we will decide which sex is most responsive, in case no gender difference is seen in rat, we can use both genders.
- The rat is the initial model of choice because of its 10-fold larger size compared to mouse.
- The mouse is the animal of choice because good colitis models exist and genetically modified mice are available. In mice colitis models we will only use female mice for colitis models as male mice have been shown to display stress and fighting behaviour which affects the outcome of colitis as described earlier (see article: <https://www.ueg.eu/education/latest-news/article/article/mistakes-in-mouse-models-of-ibd-and-how-to-avoid-them/>). In particular, male mice will fight because the colitis will set in at different time points for each mice individually in the cage. In the T-cell transfer model both male and female mice are used but in general, DeVoss and Diehl (DeVoss J and Diehl; Toxicol Pathol 2014; 42: 99–110) recommend using female animals if possible. They indicate that male animals are more prone to display aggressive behavior resulting in fighting, with the resulting stress and wounds potentially having a negative impact on a study. As said, this is also our own experience.
- Wild type and genetically modified mice (for instance adrenergic receptor-deficient mice (stock number 003810) are available from Jackson Laboratories.
- Mice will be used between 7 and 16 weeks of age (we aim to use young adults mice of 7-16 weeks but to obtain sufficient group sizes of e.g. SCID mice, we may have to deviate from the 7-16 weeks age group and use older mice).
- Genetically modified mice will be bred in the Animal facility of the AMC, whereas wild-type mice will be purchased from licenced companies like Charles River or Envigo, or when possible bred at AMC facilities. The proposed mouse strains/lines are already available.

Numbers of rats/mice: For rat and mouse DSS colitis experiments we expect to perform max 6 experiments per year with group sizes that need to be determined exactly, but based on historical data a group size of 10 rats and 6 experimental groups, amounting to 60 rats per experiment. Similarly, we expect to need 10 mice per group in further experiments, and a standard experiment has 6 experimental groups thus a total experiment is done with 60 mice per experiment. The project runs for 5 years but we will expected to need to do 6 experiments per year, as outlined in fig 4 in the protocol.

RAT experiments:

1. Pilot IBD: optimisation IBD model due to reconstruction mouse facility: we need 50 rats
2. Pulse optimisation: we need the following number of rats: we will optimize frequency (1), pulse duration (2) and current strength (3), and combinations thereof (4-6). Hence we anticipate to need 6*60 rats testing per nerve (SMN, vagal) so 3*360=1080 rats for optimisation. **So** total rats used for optimisation of the pulse will be max **1080**.

3. Number of rats needed for implant and experimental testing of the optimized pulse in rat IBD model.

We anticipate the testing of stimulation of the pulse in 2 groups of 60 rats =120 rats in 3 nerves is **360** rats.

Number of rats needed for denervation, once we have optimized the pulse on 3 nerves: **360**.

So total number of rats we anticipate to need: 50+1080+360+360=1850 in total

MICE experiments:

1. pilot IBD models due to reconstruction of animal facility: we need 250 mice.

2. Numbers of Mice needed in stimulation/denervation exps. As outlined in Fig 4 in the project, for 4 different models of IBD we need 4x360=1440 mice. This figure is built up as follows: per model, 3 nerves to test with an optimized pulse in groups of 60 mice: 180, 3 nerves that are denervated in groups of 60: 180; so 360 mice per model, 4 models: **4*360=1440** mice. For receptor KO models we need additional groups of 60 mice in 4 models, to be tested in 3 nerves (**720**) mice, for immune response/immune cell egress experiments we anticipate to require 360 mice as we will not test this in all models.

So total mice used for experiments is 7x360mice=**2520**.

So total number of mice we anticipate to need 2520+250=2770 mice in total.

Given our staged experimental design, we may choose to use one colitis model in mice that proves to be responsive in our stimulation experiments, and we may not test the intervention in all mouse colitis models. The latter will reduce the number of mice needed for the colitis experiments.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ X Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

"Vervanging" The aim of the current project is to study the extent to which neuronal innervation can be modulated to ameliorate the inflammation. To mimic the complex interplay between cell types (neuronal cells, but also cells in the lymphoid follicles, and intestinal mucosa), we need to perform the colitis experiments in which this interplay is studied in rodents. Unfortunately, such interactions require an intact organ system, and cannot be studied in vitro.

"Verfijning" Logically, to minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the rats/mice for any sign of discomfort and mice with too much discomfort (thus reaching the humane endpoint; see at point J below) will be sacrificed. To further refine the experiments, rats/mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. The fitting of electrode connectors with an aluminium cap placed on the head allows social housing of rats as we have already established. Moreover, we will enhance the chance of successful animal experiments by first optimizing electrical probe (cuff) placement and stimulation in rat, before moving to mice, so that strictly mechanistic studies can be performed in mice in a pre-optimized setting. Another point of refinement is that optimisation of the innervation of the nerves will be performed under complete anaesthesia (rats will not recover after the experiment) before progressing to the IBD model experiments.

"Reducing" To reduce the number of mice and rats to be used, we will adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments, based on earlier studies in our group in similar models and similar interventions in the neuronal system (Snoek et al, Br J Pharmacol, 2010).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing during pre-surgical placement of the cuff or denervation. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry barrier facility of the AMC). More importantly, our staged approach allows us to assess colitis in different colitis models and we have the opportunity to choose the model that is most consistent in its effect but also has the least morbidity to the animals.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "mucosal immunology", "sympathetic innervation", "parasympathetic innervation", "colitis" and "macrophages". Furthermore, we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

During denervation/implantation we will use analgesics pre and up to one day postoperatively.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Event	Group	discomfort	Duration
Anesthesia	all	light	Minutes
Surgery placing stimulation electrode	all	none	120 min
Denervation surgery			45 min
Recovery from anaesthesia	all	moderate	Hours but pain medication for 2 days
Colonoscopy under isoflurane (various time points during colitis; to be specified in WP-IVD)	all	moderate	3 min
Stimulation nerve	All except controls	Light	5-10 min per day in cage
Colitis induction	all	mild Moderate	Up to day 6 Up to day 35
Sacrifice	all	Terminal	Very brief

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Colitis will give an inflammation in the intestinal mucosa, which likely will cause pain as seen in patients

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

We monitor the rats and mice and will sacrifice animals as soon as humane endpoint are reached.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

X ☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

To be expected humane endpoints

Both after the surgery required to implant the cuff electrodes, and after the colitis-induction, the following humane endpoints will be taken into account: Weight loss higher than 20% of starting weight, retaining diarrhea after 2 days following surgery, abnormal behavior (isolation, aberrant activity and/or mobility, clear piloerection).

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Hard to say, based on experience 5%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

- Implantation of cuff electrode and head mount → under anaesthesia → mild discomfort
- Recovery from anaesthesia → moderate discomfort
- injection Tcells → mild discomfort

- Colitis model → moderate discomfort
- Stimulation of cuff electrode, including handling → mild discomfort

Rats:

1. IBD model optimisation, n=50, discomfort moderate
 2. optimisation enervation, n=1080, discomfort mild
 3. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=720 of which the control group will undergo mild discomfort (n=120) and the experimental groups will undergo (maximally) moderate discomfort (n=600).
- Overall, 35% of rats will undergo moderate discomfort.

Mice:

1. IBD model optimisation, n=250, discomfort moderate
 2. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=2520 of which the control group will undergo mild discomfort (n=420) and the experimental groups will undergo maximally moderate discomfort (n=2100),
- Overall 85% of mice will undergo mild discomfort.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

In addition to endoscopic and clinical parameters, it is essential to analyse different organs and tissues at the end of the experiment. For the experiments described here, several tissues will be analysed such as the primary and secondary lymph-nodes and intestines. Samples will be analysed using multiple assays (immunohistochemistry, FACS, ELISA, etc).

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

[REDACTED]

Meibergdreef 31

1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD118002017842

Bijlagen

1

Datum 12 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in " met aanvraagnummer AVD118002017842. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD met betrekking tot het ongerief van de dieren in het acute experiment beantwoord en de keuze om dieren van slechts één geslacht in te zetten nader onderbouwd.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a1, lid 2, zijn er algemene voorwaarden gesteld. De voorwaarde over het afstemmen met de IvD om wel dan niet ratten van beide geslachten in het chronische experiment in te zetten is met het oog op het verminderen van dieren in voorraad gedood gesteld.

U kunt met uw project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in " starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van de vergunning maximaal 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie

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

Datum:

12 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017842

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze: 

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017842

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Medisch Centrum

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022, voor het project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in " met aanvraagnummer AVD118002017842, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Zie voorwaarde.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2017, ontvangen op 17 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for inflammatory bowel disease (colitis)				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.850	35% Matig 65% Licht	
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.770	15% Matig 85% Licht	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Aanvraagnummer:

AVD118002017842

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de beslissing om wel dan niet ratten van beide geslachten in het chronische experiment in te zetten met de IvD wordt afgestemd.



Aanvraagnummer:

AVD118002017842

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD118002017842

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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