

	Inventaris Wob-verzoek W16-01								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015348								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x			x	
9	DEC-advies				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	

16 DEC. 2015



AVD 103002015348

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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10
Postbus	9101, [Redacted]
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

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

(Titel) Naam en voorletters

☐ Dhr. ☐ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

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

☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

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

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

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

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

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

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

3 Over uw project

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

Startdatum 14 _ 01 _ 2016

Einddatum 14 _ 01 _ 2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties

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

Het gebruik van GAT-Patch om te zorgen voor snellere bloedstolling bij operaties

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

Naam DEC RU DEC

Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

E-mailadres

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

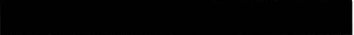
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

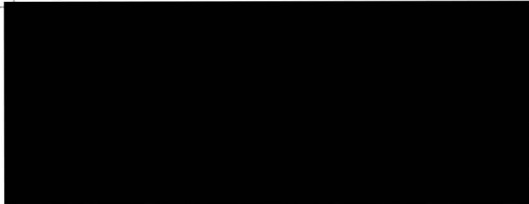
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 14 - 12 - 2015

Handtekening 

Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Het gebruik van [REDACTED] als hemostatische sealant tijdens operaties

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☐ Basic Research ☒ Translational or applied research ☐ Regulatory use or routine production ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures ☐ Higher education or training
-----	---	--

☐ Forensic enquiries

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Operaties en traumata kunnen bloedende oppervlakten veroorzaken die door het diffuse karakter moeilijk te stoppen zijn met hechtingen, klemmen, elektrische coagulatie of druk van buitenaf. Verhoogd bloedverlies en nabloedingen **zorgen voor een langere operatie- en opnameduur en veroorzaken bovendien** ernstige complicaties zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden (Kishi, Abdalla et al. 2009, Hilal, Underwood et al. 2010). Omdat tamponerende gazen bij bloedingen in de buik- en borstholte geen langdurige oplossing bieden wordt er in de buik- en borstholte gebruikt gemaakt van hemostatische sealants of patches (Öllinger, Mihaljevic et al. 2013, Hanna, Martinie et al. 2014). Dit zijn producten in de vorm van een spray die een laagje stollingsfactoren aanbrengt of in de vorm van een platte spons bestaande uit een basis van (dierlijk) collageen of gelatine. Collageen activeert bloedplaatjes en zet daarmee de eerste fase van bloedstolling in gang ('passieve stolling'). Een voorbeeld van een collageenspons is Hemotese®. Sommige producten () voegen extra componenten, zoals fibrinogeen of thrombine, toe aan de spons om actief de bloedstolling te bevorderen. Omdat de productie van zulke humane fibrinecomponenten erg kostbaar is, zijn ook de eindproducten erg duur. Deze producten, , zijn daarom alleen in kleine formaten te verkrijgen en worden in de kliniek met grote terughoudendheid gebruikt. **Desondanks wordt er wereldwijd jaarlijks voor bijna 150 miljoen dollar aan verbruikt, wat neerkomt op zo'n 400.000 tot 1.000.000 stuks. Dit is een indicatie van de frequentie waarin 1 soort patch wordt gebruikt. wordt in de buikchirurgie vooral gebruikt bij leverresecties.**

In totaal worden er wereldwijd per jaar ruim 250 miljoen chirurgische ingrepen gedaan, waarbij ernstige bloedingen kunnen optreden (Weiser et al, Lancet 2008). Ze worden onder andere vaker gezien bij operaties aan de lever en bij traumatische of chirurgische letsels van de milt. Het aantal leverresecties is moeilijk te bepalen, maar gezien de wereldwijde incidentie van primaire leverkanker (rond 1 miljoen) en leveruitzaaiingen van borst-, long- of darmkanker (>1 miljoen), wordt het aantal hoog ingeschat (cancer.org). Bij leverresecties varieert het bloedverlies van 500-2500ml en heeft zo'n 25% van de patiënten bloedtransfusie nodig. Verder is fors bloedverlies vaak een reden om een kijkoperatie te converteren naar een open buik operatie, en is het in sommige studies geassocieerd met een mortaliteit van 23-46% (Romano et al., HPB Surgery 2012; Hilal et al. J Gastroint Surg 2011; Belghiti et al., JACS 2000).

Miltletsels worden gezien bij een kwart van de stompe buiktrauma's in traumaziekenhuizen, maar vaak is hier geen chirurgische behandeling voor nodig. Dit is vaak wel het geval bij een chirurgisch letsel van de milt, wat onder andere kan optreden bij operaties aan maag, darmen, alveesklie en nier. Helaas worden miltbloedingen die tijdens de operatie behandeld worden vaak niet vermeld in wetenschappelijke publicaties maar het aantal wordt geschat op 5-10%. Bij deze kleinere miltbloedingen worden hemostatische producten vrijwel altijd toegepast omdat andere technieken om deze miltbloedingen te stoppen falen.

In het kader van een Europees onderzoeksproject (EFRO) is er een nieuw polymeer ontwikkeld dat gebruikt kan worden om collageensponzen mee te bedekken om te zorgen voor effectievere hemostase dan de collageenspons alleen. Dit polymeer bestaat uit een basis van [REDACTED] waaraan meerdere *N*-hydroxysuccinimide (NHS)-groepen zijn gekoppeld. Deze NHS groepen binden aan de NH₂ groepen van eiwitten in het bloed en eiwitten op organen waardoor de stolling op gang kan komen. In deze aanvraag is het polymeer afgekort tot POX-NHS. Met *in vitro* en *ex vivo* experimenten is aangetoond dat POX-NHS zorgt voor stolling (gelvorming) van zowel Bovine Serum Albumine (BSA) als gehepariniseerd bloed en heeft een werking onafhankelijk van diersoort en stollingscascade. Door een kale collageenspons te coaten met POX-NHS is er een hemostatische patch gemaakt, welke in deze projectaanvraag verder zal worden aangeduid als [REDACTED]

Verhoogd bloedverlies en nabloedingen zorgen voor ernstige complicaties zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden en dragen bij aan een langere operatie- en opnameduur.

De theoretische voordelen van [REDACTED] boven bestaande producten zijn een vermindering van het bloedverlies en de daaraan gerelateerde complicaties door:

- 1. Een betere hechting aan orgaan oppervlakten zodat het product beter op zijn plaats blijft en tegendruk kan geven bij een bloeding**
- 2. Het vormen van een gel bij contact met bloed, waardoor de bloeding sneller stopt dan bij 'passieve' stolling**

Daarnaast is het een synthetisch product om actieve stolling te bewerkstelligen, met een eenvoudiger productieproces, waardoor het uiteindelijke product 5 tot 10 maal goedkoper wordt dan bestaande producten. Omdat [REDACTED] synthetische bestanddelen gebruikt om actieve stolling te bewerkstelligen is het bovendien niet nodig om gebruik te maken van bloeddonaties om humaan fibrinogeen en thrombine te verkrijgen, zoals bij [REDACTED] wel het geval is.

[REDACTED] is in de ontwikkelfase en op dit moment zijn er meerdere prototypes. Deze verschillen van elkaar met betrekking tot de precieze samenstelling van de actieve component [REDACTED] derivaat). Sommige hebben bijvoorbeeld een hoger percentage plakkende NHS-groepen. Andere hebben door gebruik van andere zijketens een meer hydrofiel, dan wel hydrofoob, karakter. Aan de hand van *ex vivo* testen, waarin we de sterkte van de hechting met bloed hebben getest, hebben we een eerste selectie van prototypes gemaakt. Lopende *in vitro* en *ex vivo* experimenten moeten deze selectie nog verder optimaliseren, en zo mogelijk verkleinen.

In het huidige projectvoorstel gaan we verder met de volgende stap, waarin wordt onderzocht welke van de prototypes van [REDACTED] het beste functioneert als er een actieve bloeding is in de buikholte. Hierbij spelen factoren mee zoals bloeddruk, stolling, temperatuur, ademhalingsbewegingen, peristaltiek van darmen in de buurt en inflammatoire reacties door de aangebrachte schade. Hiervoor is het nodig om gebruik te maken van levende proefdieren. Daarnaast willen we onderzoeken hoe effectief [REDACTED] is in vergelijking met bestaande producten, hoe lang het in het lichaam aanwezig blijft en of het product ongewenste bijwerkingen heeft. **Ook willen we bestuderen of het gebruik van [REDACTED] veilig is in een geïnfecteerde omgeving, omdat er bij buikoperaties sprake kan zijn van bacteriële contaminatie en infecties hardnekkiger kunnen verlopen als er vreemdlichaam ([REDACTED] materiaal aanwezig is.** We hebben het project opgedeeld in verschillende onderdelen welke **hieronder staan vermeld en die** verder worden beschreven onder 3.4 Onderzoeksstrategie.

1. Hemostase model rat

a. Pilot hemostase model

Er zullen drie modellen voor hemostase van leverbloedingen worden getest en gevalideerd, zodat de meest geschikte kan worden gebruikt in de volgende experimenten. De drie modellen betreffen verschillende methodes om een bloeding te induceren: dikke naaldpunctie, biopsie laesie en verwijderen stukje lever.

b. Prototypeselectie en 'proof of principle'

Een geschat aantal van 6-12 prototypes zal worden getest op hun werking en de interactie met orgaanweefsel. Het meest geschikte prototype zal worden geselecteerd en vervolgens worden gebruikt in de rest van het project.

2. Hemostase model varken

a. Pilot hemostase model

Een model voor lever- en miltbloedingen zal opgezet worden in varkens. Het model betreft het aanbrengen van meerdere bloedingslaesies op de lever en milt van ieder varken, waarop vervolgens de patches (of controles) worden aangebracht. Eventueel wordt er een tweede dier gebruikt, vooraf behandeld met heparine, als de laesies in het eerste dier niet voldoende voldoende bloeden.

b. Veiligheid en Effectiviteit

Het meest geschikte prototype van () zal worden getest op het bereiken en behouden van hemostase (effectiviteit). Daarbij zal de werking worden vergeleken met bestaande producten. Na verschillende termijnen zal een tussentijdse inspectie met laparoscopie worden gedaan, waarbij ook de werking bij laparoscopie wordt bestudeerd. Vervolgens zullen dieren na verschillende termijnen worden opgeofferd; het optreden van complicaties (veiligheid) wordt bestudeerd en weefsels en vloeistoffen worden geanalyseerd op (verstoringen van de) genezing.

3. Afbraak en langetermijneffecten rat

In een rattenmodel zullen de afbraaksnelheid en afbraakreacties worden onderzocht. Hiervoor zullen lange termijn experimenten (<3 maanden) worden gebruikt.

4. Veiligheid bij contaminatie rat

Er zal worden onderzocht wat de gevolgen zijn van het gebruik van () als er sprake is van contaminatie, door gebruik te maken van een rattenmodel waarbij de buikholte wordt gecontamineerd (d.m.v. 'Cecal Ligation Puncture' of inoculatie met bacteriële/fecale suspensie).

5. Ernstige bloedingen varken

In een non-survival model zullen meerdere ernstigere bloedingen van solide organen (lever/nier/milt), sacrale veneuze plexus en slagaderen vaten worden gemaakt, om de effectiviteit van () hiervoor te testen.

3.2 Purpose

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

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

Samenvattend is het doel van dit project om te onderzoeken of [REDACTED] een nieuwe, goedkope, grotendeels synthetische, hemostatische patch, effectief en veilig is voor bloedingen in de buikholte waarbij reguliere en eenvoudige behandelmethodes (hechting, electrocoagulatie) minder effectief of niet mogelijk zijn.

Haalbaarheid

Binnen [REDACTED] is er veel ervaring met buikoperaties bij ratten en varkens, dus ook veel ervaring met de benodigde zorg rondom de operaties. **Daarom verwachten we geen problemen met de logistieke uitvoer van de experimenten.** Er is nog weinig ervaring met de geplande diermodellen voor het gebruik van hemostatische patches. **Om die reden hebben we zowel voor het rattenmodel als het varkensmodel pilotexperimenten ingebouwd om de modellen te oefenen en valideren. Op basis van onze ruime ervaring met buikoperaties bij ratten en voorbereidende testen met dode ratten, schatten we in dat de rattenexperimenten goed haalbaar zijn.**

Er is een centrum in [REDACTED] bezocht om mee te kijken bij een varkensmodel voor hemostase. In [REDACTED] worden kale collageensponsen gemaakt en op verkennende wijze getest. Door mee te kijken met het model bij een varken hebben we een goede indruk gekregen van de uitvoering en haalbaarheid van de proef. Wel denken we dat het nog nodig is om pilotstudies te doen om de geplande diermodellen te oefenen en intern te valideren. Uit onze contacten met [REDACTED] weten we dat ons gepland onderzoek geen onnodige herhaling is. Bovendien is het onderzoek in [REDACTED] 'marketing driven' en worden experimenten daar niet met een **wetenschappelijke vraagstelling uitgevoerd.** Vanwege de goede in vitro resultaten waarin we zelfs een effect hebben gezien met gehepariniseerd bloed (geblokkeerde bloedstolling) zijn we optimistisch over de kans op effectiviteit van het biomateriaal.

3.3 Relevance

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

Het medisch en maatschappelijk belang van het huidige project omvat het verbeteren van de klinische uitkomst van chirurgische ingrepen en traumatische letsels van solide organen en andere structuren in de buik- en bekkenholte, door het verminderen van de hoeveelheid bloedverlies en benodigde transfusies, verkorten van de operatieduur, het terugdringen van het aantal postoperatieve complicaties in relatie tot een nabloeding, het verkorten van de opnameduur en terugdringen van de (ziekenhuis)kosten. Omdat het product geen gebruik maakt van humane componenten is de kans op overdracht van bijvoorbeeld virussen met dit product nihil. Omdat het uiteindelijke product vele malen goedkoper zal zijn dan bestaande producten wordt een bijdrage geleverd aan de beheersing van zorgkosten. Het product is ook een stap voorwaarts in de richting van een volledig synthetisch, niet humaan en niet dierlijk, hemostatisch product wat past in de maatschappelijke visie om geen dieren en mensen meer te gebruiken voor biomaterialen. Door vergelijken van in vitro testen met perfusiemodellen en de dierproeven kan worden beoordeeld of deze in vitro modellen in de toekomst (een deel van) de dierproeven kan vervangen.

Daarnaast dient het project een wetenschappelijk belang omdat het de kennis vergroot over een nieuw ontwikkeld materiaal waardoor wellicht andere toepassingsgebieden worden ontdekt.

3.4 Research Strategy

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

Het betreft hier een gefaseerd project, waarbij de volgorde van de experimenten hieronder wordt beschreven. Ter verduidelijking; er wordt pas aan een volgende stap begonnen als de resultaten daartoe aanleiding geven.

1. Hemostase model rat
 - a. *Pilot hemostase model*
 - b. *Prototypeselectie en 'proof of principle'*
☐
2. Hemostase model varken
 - a. *Pilot hemostase model*
 - b. *Veiligheid en Effectiviteit*
☐
3. Afbraak en langetermijneffecten rat
☐
4. Veiligheid bij contaminatie rat
☐
5. Ernstige bloedingen varken

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

De doelen van dit project per onderdeel zijn:

1.Hemostase model rat

a.Pilot hemostase model

Opzetten van een hemostase model in de rat (lever), omdat de geschiktheid van het model voor het testen van XXXXXXXXXX nog uitgezocht moet worden en er nog geen ervaring mee is binnen onze afdeling. Een rattenmodel is voor deze fase geschikt vanwege de grootte van het proefdier en de grotendeels overeenkomende stollingscascade.

b.Prototypeselectie en 'proof of principle' Bepalen welk prototype van XXXXXXXXXX het meest geschikt is met betrekking tot tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies en onderzoeken welke (vreemd lichaam) reacties deze veroorzaakt na aanbrengen op weefsel. De prototypes verschillen in samenstelling en hoeveelheid van het actieve polymeer, waardoor zowel de effectiviteit als de interactie met lichaamsweefsel anders kunnen zijn. **Verschil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen.** We verwachten op basis van ervaringen met verscheidene andere geteste biomaterialen dat de soort (vreemd lichaam) reactie in de rat representatief is voor de mens.

2.Hemostase model varken

a. Pilot hemostase model

Opzetten van hemostasemodel in varken, zodat er tijdens de vervolggexperimenten onder 2b geen sprake meer is van leercurve en de kans op onvoorziene omstandigheden zo klein mogelijk is. We gebruiken hier een varkensmodel omdat de anatomie, grootte en fysiologie van de organen(systemen) en de significantie van de bloedingen van bijvoorbeeld een beschadigd lever of milt oppervlak lijken op die van de mens. De stollingsmechanismen lijken ook op elkaar.

b. Veiligheid en Effectiviteit

Bepalen of effectieve en veilige hemostase kan worden bereikt en de effectiviteit van [] vergelijken met bestaande producten. We willen [] vergelijken met kale collageensponzen om de aanvullende waarde van het polymeer te onderzoeken, met andere NHS-gecoate collageensponzen [] met PEG-NHS) om de aanvullende waarde van de POX-NHS formule te bepalen, en met de 'fibrinogeenspons' [] omdat deze, op dit moment geldt, als gouden standaard in de buikchirurgie.

Daarnaast willen we het laparoscopische gebruik van [] bestuderen. Deze keuze wordt gemaakt omdat steeds meer buikoperaties laparoscopisch worden uitgevoerd en het moeilijker kan zijn om bloedingen tijdens scopische ingrepen te stoppen en de omstandigheden tijdens laparoscopie (gebruik van CO2 gas en verhoogde buikdruk) de hemostase en daarmee de werking van de [] kunnen beïnvloeden. Tenslotte zal in dit onderdeel ook de lange termijn veiligheid worden bestudeerd.

3. Afbraak en langetermijneffecten rat

Nauwkeurig bepalen wat de afbraaksnelheid, afbraakreacties en eliminatie uit het lichaam van het product zijn, en de spreiding hierin. Van de 'kale' collageenspons is bekend dat deze gemiddeld binnen 8 weken is afgebroken zonder nadelige reactie. [] bestaat qua moleculair gewicht grotendeels uit de POX-NHS polymeer dus er kan niet worden 'gevaren' op de gegevens van de 'kale' spons. De polymeer bestaat uit afbreekbare componenten, waarvan afzonderlijk geen nadelige effecten bekend zijn. Het is nog onbekend hoe de gehele polymeer zich gedraagt en in combinatie met een collageenspons tijdens deze afbraak en eliminatie periode.

4. Veiligheid bij contaminatie rat

Bepalen of gebruik van [] veilig is als er sprake is van contaminatie.

Bij operaties in de buikholtte aan de darmen (wat zeer frequente operaties zijn) is er sprake van contaminatie. Bij aanwezigheid van bloed(stolsels) en vreemd lichaamsmateriaal kan contaminatie sneller tot een infectie leiden die ook een ernstiger beloop hebben dan zonder vreemd lichaam en de effectiviteit van het materiaal teniet kan doen. Vanwege de potentiële toepassing in een gecontamineerde omgeving moet [] hierop worden onderzocht.

5. Ernstige bloedingen varken

Omdat het gebruik van [] ook bij ernstige bloedingen erg waardevol kan zijn en zich kan onderscheiden van bestaande middelen wordt [] in deze situaties bestudeerd. Voorbeelden van situaties/ingrepen met ernstige bloedingen zijn:

- Leverresecties met grote wondoppervlakten. Deze ingrepen nemen in frequentie toe en worden ook vaker herhaald gedaan bij dezelfde patiënt in verband met uitzaaiingen van darmkanker.
- Miltletsels met groter wondoppervlak: dit kan optreden bij stompe buiktrauma's en als complicatie bij buikoperaties. Vanwege aanhoudende bloedingen moet een miltverwijdering worden gedaan wat onwenselijk is in verband met de miltfunctie bij de afweer.
- Nierresecties: vooral partiële nierresecties ivm niertumoren.
- Sacrale veneuze plexus letsels: moeilijke te stoppen bloedingen die in veel situaties kan voorkomen (o.a. bekkenfractuur, endeldarm-, baarmoeder en prostaatoperaties)
- Slagaderlijke bloedingen: meer verkennend zal er worden gekeken naar de toepassing van [] bij bloedingen uit slagaderen (hogere druk). Andere producten falen in deze omstandigheden. Het hechten van deze bloedingen is soms moeilijk (dieper gelegen

structuren) en kan leiden tot vernauwingen en occlusie van het bloedvat. Met een weefsel plakkende patch van buitenaf op het vat zou een vernauwing en occlusie kunnen worden voorkomen.

Aangezien de keuze voor een of meerdere van deze toepassingen aan het einde van het project pas duidelijk worden, wordt dan ook pas bepaald in hoeverre onderdeel uitgevoerd zal gaan worden.

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

In het pilot deel van dierproef 1 zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen te groot is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest. Verder worden in onderdeel b van dierproef 1 eerst de subgroepen gedaan met opoffering op dag 1. Zo kan al een goede eerste indruk worden verkregen van de effectiviteit en weefselreacties. Als het prototype goed lijkt te functioneren en terug te vinden is op de laesie, zullen ook de experimenten met de andere subgroepen uitgevoerd worden.

Als uit de experimenten in dierproef 1 blijkt dat het coaten van de collageenspons leidt tot een verbeterde effectiviteit en er geen grote complicaties (zoals forse ontstekingsreacties of abcesvorming) optreden, dan zal het beste [REDACTED] prototype worden uitgekozen en zal hiermee verder worden in dierproef 2. Als uit dierproef 2 blijkt dat [REDACTED] ook in een groot proefdier werkt en qua effectiviteit minimaal gelijkwaardig is aan bestaande producten, zullen we verder gaan met dierproef 3 en 5. De contaminatie experimenten in dierproef 4 zullen pas worden gestart nadat de lange termijn effecten in dierproef 3 zijn onderzocht en hierbij geen ernstige complicaties zijn opgetreden.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	3.4.4.1 Hemostasemodel rat
2	3.4.4.2 Hemostasemodel varken
3	3.4.4.3 Afbraak en langetermijneffecten rat
4	3.4.4.4 Veiligheid bij contaminatie rat
5	3.4.4.5 Ernstige bloedingen varken

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure 3.4.4.1 Hemostasemodel rat

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

De doelen van dit onderdeel zijn:

a. Pilot hemostasemodel

- Opzetten van een hemostasemodel in de rat.

b. Prototypeselectie en proof of principle

- Bepalen of hemostase kan worden bereikt met [REDACTED]
- Onderzoeken welke (vreemdlichaam) reacties [REDACTED] veroorzaakt bij aanbrengen op orgaanweefsel.
- Bepalen welk prototype van [REDACTED] het meest geschikt is.

In het huidige onderdeel zullen we gebruik maken van een rattenmodel waarbij er een bloeding van de lever wordt geïnduceerd die vervolgens met een patch behandeld zal worden. We hebben een systematische search gedaan naar modellen voor hemostatische producten. Hieruit bleek dat er varkens, honden, konijnen, ratten en muizen worden gebruikt, en dat er verschillende methodes worden beschreven voor het induceren van bloedingen en voor het scoren van hemostase. Het aantal gepubliceerde dierstudies was te klein, en de variatie tussen de modellen te groot, om op systematische wijze uit te zoeken welk model het meest geschikt is.

De redenen dat we voor een rattenmodel met leverbloeding hebben gekozen zijn:

- **Het bereiken van hemostase van leverbloedingen is de belangrijkste toepassing van [REDACTED]. Daarom gebruiken we in deze fase geen milt- of nierletsels." Bovendien zijn milt en nier bij ratten dermate klein dat er onvoldoende ruimte is om de patch met een adequate marge rondom een bloeding te positioneren. Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden met een varkensmodel in dierproef 3.4.4.2. Onderzoek van miltletsel is klinisch relevant omdat de milt het meest voorkomende orgaan is dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval)**

- Onze afdeling heeft het meeste ervaring met buikoperaties bij ratten.

- Uit *ex vivo* proeven is gebleken dat de afmeting van een rattenlever geschikt is voor het aanbrengen van kleine stukjes [REDACTED]. Bij gebruik van muizenlevers zouden de afmetingen van [REDACTED] teveel moeten worden verkleind **zodat er onvoldoende overlap van de patch rondom de bloeding is en er daardoor te weinig ruimte is voor de relatief te grote patch goed te positioneren.**

- Omdat het doel van dit onderdeel is om de effectiviteit en weefselreacties van de prototypes te verkennen, en niet om de resultaten direct te vertalen naar de mens, verkiezen we in dit onderdeel de praktische kant van een klein proefdier boven de translationele waarde van grote proefdieren (varkens).

Omdat er meerdere methodes bestaan om leverbloedingen te induceren, en het nog niet duidelijk is welke hiervan het meest geschikt is, zullen we eerst een pilot experiment uitvoeren waarin we deze methodes testen. De geschiktheid hangt onder andere af van de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies bij gebruik van hemostatische sponzen. Deze zijn niet goed te herleiden uit de beschikbare literatuur. Het bloedverlies moet

dusdanig veel zijn dat er door aanbrengen van kale collageensponzen niet te snel hemostase optreedt. Echter, het moet wel reëel zijn om hemostase te kunnen bereiken binnen enkele minuten.

De drie methodes om de bloeding te induceren die we zullen testen zijn:

1. Verwijderen stukje lever. Lijkt meer op kliniek bij leverresecties en waarschijnlijk voldoende bloedverlies, maar moeilijk om te standaardiseren (Schmiedt, Köhler et al. 2012).
2. Biopsie laesie. Goed te standaardiseren en praktische grootte van bloeding, maar niet eerder beschreven in literatuur.

We beginnen eerst met deze twee methoden, mocht blijken dat er te toch teveel bloedverlies ontstaat, dan testen we de volgende:

3. Naaldpunctie. Goed te standaardiseren, **klinisch relevant voor een peroperatieve naald biopsie van de lever bij diagnostiek naar diepe leverafwijkingen en tumoren**, mogelijk gering bloedverlies. (Murakami, Yokoyama et al. 2008)

Planning experimentele opzet/groepen:

a. Pilot hemostasemodel

Bij alle dieren zullen er minimaal twee leverletsels worden aangebracht; indien de grootte van de lever en het bloedverlies het toelaat, zullen er meerdere laesies worden aangebracht. Om te bepalen welke methode het meest geschikt is zullen we gebruik maken van de volgende groepen laesies:

Groep P1: verwijderen stukje lever. Transversale resectie 3-5mm van de onderrand van de leverkwab, behandeling met kale collageenspons (P1a) of [REDACTED]

Groep P2: biopsie laesie. Met ronde biopsie punch, behandeling met kale collageenspons (P2a) of [REDACTED] (P2b)

Groep P3: naaldpunctie. Punctie met holle injectienaald, behandeling met kale collageenspons (P3a) of [REDACTED] (P3b)

Elke groep **in de pilot** zal dus worden onderverdeeld in de volgende subgroepen:

- a: aanbrengen van kale collageensponzen (negatieve controle)
- b: aanbrengen van [REDACTED] ('positieve' controle).

Als primaire uitkomsten zal de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies worden bepaald. Het model waarbij een dusdanige bloeding optreedt zodat we het product voldoende kunnen testen zonder dat het dier lijdt aan teveel (**>1.5mL of >10% van circulerend volume**) bloedverlies, zullen wij in de vervollexperimenten gaan gebruiken. Na de interventies zal het dier, terwijl het nog onder narcose is, worden gedood door verbloeding en cervicale dislocatie.

b. Prototypeselectie en proof of principle

Afhankelijk van de pilot resultaten zal de meest geschikte 'leverletsel-methode' in deze experimenten worden gebruikt. Per groep zal er een verschillend prototype van [REDACTED] of een controleproduct worden getest. De primaire uitkomsten zijn de hoeveelheid bloedverlies en de tijd tot het bereiken van hemostase. Na het bereiken van hemostase zal de buik worden gesloten. **Als secundaire uitkomst zal worden gekeken naar de weefselreacties op korte termijn met behulp van beschrijvende histologie. De dieren zullen op dag 1, 3 of 7 (subgroep a,b,c) worden opgeofferd en na inspectie van de buikholte op eventuele nabloedingen zal er weefsel worden afgenomen.**

Groep 1 (**a,b,c**): controle met gazen, om hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te bepalen (**negatieve controle**)

Groep 2 **(a,b,c)**: controle met [REDACTED], als referentieproduct*

Groep 3 **(a,b,c)**: controle met kale collageenspons, om meerwaarde van polymeren te bepalen

Groep 4 **(a,b,c)** - 15 **(a,b,c)**: [REDACTED]-P1-12

Specifieke invulling van prototypes zullen nog nader worden bepaald. **Verschillen tussen de prototypes zitten vooral in verhouding tussen de hoeveelheid [REDACTED] en NHS groepen en de dichtheid waarmee het polymeer op de collageenspons wordt gezet. Dit uit zich in de verschillende groepen in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, de mate van absorbtie.**

*omdat [REDACTED] (huidige standaard) een dikker is dan [REDACTED] en daarnaast minder flexibel en aanzienlijk duurder is, achten wij het minder geschikt om als controleproduct te gebruiken in dit rattenmodel. In dierproef 2 (varkensmodel) zal het wel gebruikt worden als controleproduct.

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

Zie ook antwoord 2A.1. Samengevat zullen in dit onderdeel de volgende (be)handelingen worden verricht.

1. Wegen/observatie: dagelijks ter monitoring van welzijn en ter bepalen injectievolume pijnstilling
2. Subcutane injectie met buprenorphine: pre- en postoperatief 2x/dag gedurende 48 uur ter pijnstilling
3. Anesthesie met isofluraan: gedurende 30-60 minuten als narcose voor de operatie
4. Staartvenepunctie: pre- en postoperatief ter verkrijgen van bloed voor bepalen stollingswaarden
5. Laparotomie met induceren van tenminste twee leverbloedingen per rat + aanbrengen hemostatische patch als experimentele interventie van dit experiment. In experiment b zullen de dieren voor het eind van de operatie ook extra vocht toegediend krijgen ter compensatie van het bloed- en vochtverlies tijdens de operatie.
6. Observatie hemostase
7. Ofwel opoffering onder narcose in de pilotgroepen (experiment a) OF relaparotomie na 1, 3 of 7 dagen na de operatie (experiment b), zodat de effectiviteit en weefselreacties op de korte termijn kunnen worden bepaald. De dieren worden dan aan het eind van de operatie geofferd. Deze tijdpunten zijn gekozen om te inventariseren of er eventuele kleine nabloedingen optreden en wanneer dit gebeurt. Deze kleine bloedingen kunnen ontstaan door onvoldoende stabiliteit in de initiële stolsels.

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

De voorlopige berekening voor het benodigde aantal testen per sample is verwerkt in onderdeel B1.

Door het gebruik van een pilot experiment kan het juiste model gekozen worden, en kan de groepsgrootte voor de daarop volgende experimenten beter worden bepaald. In het pilot deel zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen teveel is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest

In onderdeel b zullen de prototypes die uit de in vitro / ex vivo experimenten de meest veelbelovende resultaten lieten zien, gebruikt worden. Verder worden in onderdeel b eerst de subgroepen gedaan met opoffering op dag 1. Zo kan al een goede eerste indruk worden verkregen van de effectiviteit en weefselreacties. Als het prototype goed lijkt te functioneren en terug te vinden is op de laesie, zullen ook de andere subgroepen gedaan worden.

B. The animals

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

Soort: Rat
Ras: Wu (Wistar)
Geslacht: beide
Leeftijd: adult
Herkomst: registered EU breeder

Geschatte aantallen

a Pilot

Groepen:
Groep P1a/b: verwijderen stukje lever. Behandeling met kale collageenspons/ [redacted]
Groep P2a/b: biopsie laesie. Behandeling met kale collageenspons [redacted]
Groep P3a/b: naaldpunctie. Behandeling met kale collageenspons [redacted]
Totaal aantal groepen: 6
Aantal laesies per groep: 6 (+4*)
Gemiddelde aantal dieren per groep: 5
Subtotaal aantal dieren voor pilot: 30

* Per dier kunnen minimaal 2 laesies gemaakt worden. Per groep schatten we 6 laesies nodig te hebben (dus 3 dieren) nodig te hebben om een goede indruk van de krijgen van de tijd tot hemostase (Schmiedt, Köhler et al. 2012). Omdat er sprake zal zijn van een leercurve en onvoorziene omstandigheden, schatten we per groep vier extra laesies (twee dieren) nodig te hebben.

b Prototype selection

Groepen:
Groep 1 (**a,b,c**): controle met gazen, om hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te bepalen (**negatieve controle**)

Groep 2 (a,b,c): controle met ████████, als referentieproduct

Groep 3 (a,b,c): controle met kale collageenspons, om meerwaarde van polymeren te bepalen

Groep 4 (a,b,c) - 15 (a,b,c): ████████-12

De groepsgrootte zal door middel van een powerberekening worden bepaald. Daarbij zal gebruik gemaakt worden van sample size calculator op: <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>.

De benodigde sample size zal worden berekend om te bepalen of het ████████-prototype (groep 4-15) zorgt voor een significant snellere hemostase ten opzichte van de huidige standaard (groep 2). Omdat daarnaast ook zal worden vergeleken met groep 3, wordt er een bonferroni correctie toegepast voor 3 vergelijkingen. Omdat groep 1 enkel wordt gebruikt als negatieve controle, zal hiervoor niet worden gecorrigeerd. Ook wordt er per prototype niet verder gecorrigeerd voor de mogelijke extra vergelijkingen, omdat de vergelijking met de gouden standaard de belangrijkste blijft.

Benodigde sample size per groep: 18 laesies (+2*)

Totaal aantal voor 15 groepen: 300 laesies

Totaal aantal benodigde dieren: 150

* Rekening houdend met uitval en onvoorziene omstandigheden schatten we per groep twee extra laesies (een dier) nodig te hebben

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat, wistar	Registered EU breeder	180	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging& vermindering

In de ontwikkelingsfase van █████ is gebruik gemaakt van *in vitro* en *ex vivo* experimenten (o.a. met bloed van mensen en ratten) om tientallen prototypes te testen en hun effectiviteit in te schatten. Daarmee is het gebruik van proefdieren voor dit doel vermeden.

Omdat het algemeen functioneren van █████ in dit onderdeel wordt gescreend, dient het tevens als pilot voor de rest van het project. Mochten er onverwachte complicaties of tegenvallende prestaties worden gezien, dan bespaart dit het gebruik van varkens en ratten in de volgende onderdelen.

Verder wordt het aantal proefdieren beperkt doordat er meerdere laesies per dier worden aangebracht.

Verfijning

Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten. Daarbij maken we gebruik van maatregelen om de kans op bias te verminderen (randomisatie, blinding) en doen we de operaties met aseptische technieken om de kans op infectieuze complicaties van buitenaf te verminderen. Tenslotte proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. De dieren worden gehuisvest volgens vigerende protocollen. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren aan het eind van de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumain lijden te minimaliseren (zie sectie J. Humane eindpunten).

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

Zie punt D.1

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

N.V.T.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

H. Pain and pain relief

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

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

Voor (gas)anesthesie wordt gebruikt gemaakt van isofluraan.

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van buprenorphine

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In de pilot groepen is er sprake van lichte stress bij het onder narcose brengen van de dieren. Door de concentratie isofluraan bij inslapen op 5% te zetten, wordt gepoogd deze stress te beperken.

In experiment b is er na de buikoperatie altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er tot 48 uur na de operatie pijnstilling gegeven. Indien nodig wordt er (nat) voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst om het eten en drinken te vergemakkelijken. **Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.**

Verder worden dieren post-operatief in tweetallen gehuisvest, en worden alle procedures door ervaren mensen uitgevoerd.

Omdat er tijdens de operatie leverletsel wordt aangebracht, bestaat er een theoretische kans op een nabloedingen. We schatten deze kans in als zeer laag (<5%), omdat de operatie pas wordt beëindigd als er adequate stolling is opgetreden. Mocht er toch een nabloeding ontstaan, dan zou dit kunnen resulteren in buikpijn en darmobstructie (door stoppen van peristaltiek), en bij ernstig bloedverlies kan het dier in shock raken of overlijden. Verder bestaat er een kleine (<5%) kans op ontstekingen en verklevingen, die eventueel ook ongerief met zich mee kunnen brengen.

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt in antwoord onder I.1.

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

Verwerkt in antwoord onder I.1.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een verslechterde conditie of verdenking op peritonitis of nabloeding, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. Ook bij een gewichtsverlies van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht, of een verlies van meer dan 15% binnen 2 dagen, wordt het humane eindpunt bereikt.

Indicate the likely incidence.

De kans op complicaties na een laparotomie bij de rat is zeer klein. Ook schatten we de kans op postoperatieve complicaties door het leverletsel in als zeer beperkt. Derhalve verwachten we dat het percentage dieren dat het humane eindpunt haalt kleiner is dan 5%.

K. Classification of severity of procedures

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

In de pilot groepen (17%): terminaal

In de interventie groepen (83%): matig (obv bijkomen van buikoperatie).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

L. Method of killing

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

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van GAT-P en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als het lever/huidweefsel van de ratten nodig voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden opgeofferd.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure 3.4.4.2 Hemostasemodel varken

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

De doelen van dit onderdeel zijn:

a. Pilot hemostase model

- Opstellen van hemostasemodel in varken

b. Experiment: Veiligheid en effectiviteit

Primaire doelen:

- Bepalen of veilige hemostase kan worden bereikt (hoeveelheid bloedverlies)
- Onderzoeken hoe effectief [REDACTED] is vergeleken met bestaande producten (tijd tot hemostase)
- Bepalen of, en hoe, [REDACTED] laparoscopisch gebruikt kan worden

Secundaire doelen:

- Een indicatie krijgen van de langetermijneffecten

Tertiaire doelen:

- Verkennen van de toepassing bij hoog risicobloedingen

Hiervoor zullen we in dit onderdeel gebruik maken van een varkensmodel waarbij er bloedingen van de lever en milt worden geïnduceerd die vervolgens met een patch behandeld worden. We hebben een systematische search gedaan naar modellen voor hemostatische producten. Hieruit bleek dat er varkens, honden, konijnen, ratten en muizen worden gebruikt, en dat er verschillende methodes worden beschreven voor het induceren van bloedingen en voor het scoren van hemostase. Het aantal gepubliceerde dierstudies was te klein, en de variatie tussen de modellen te groot, om op systematische wijze uit te zoeken welk model het meest geschikt is. De redenen dat we voor een varkensmodel met lever- en miltbloeding hebben gekozen zijn:

- om te bepalen of bij mensen veilige hemostase kan worden bereikt is het nodig dit te testen op orgaanlaesies met een klinisch relevante grootte en anatomie en vergelijkbaar stollingsmechanisme; hiervoor zijn varkensorganen geschikt. **Bij leveroperaties ontstaan er grote bloedende resectievlakken, die voor een groot deel met electrocoagulatie kunnen worden behandeld. Daarbij blijven er echter vaak enkele bloedende plekken over die een kleinere diameter (1-2cm) hebben, maar die wel hardnekkig kunnen blijven bloeden. Bij het behandelen van dergelijke laesies met een patch is er een niet bloedende marge van zo'n 1 cm rondom nodig. Rattenlevers zijn net te klein om patches van 3x3cm (overlap 1 cm bij defect 2 cm) goed te positioneren.**
- Bestaande producten zijn ook met dergelijke modellen getest (Lewis, Schiviz et al. 2014)
- Door de grootte van de milt en lever van varkens kunnen er meerdere samples per dier worden getest. Met name de milt is erg lang bij varkens en daardoor zeer geschikt. **Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden in dit model, omdat onderzoek van miltletsel klinisch relevant is: de milt is het meest voorkomende orgaan dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-,**

sportongeval) Het orgaanoppervlak van de milt lijkt bovendien erg veel op dat van andere solide organen, waaronder de lever. Door ook de varkensmilt te gebruiken kan er meer informatie worden verkregen en worden er zo weinig mogelijk dieren gebruikt.

Planning experimentele groepen:

a. *Pilot hemostase model*

Groep P1: Pilot zonder heparine + testen verschillende types laesies

Groep P2: Pilot met heparine + testen verschillende types laesies

Toelichting: In de literatuur zijn modellen beschreven waarbij de dieren worden gehepariniseerd, om de bloedstolling te vertragen. Omdat hier in de kliniek meestal geen sprake van is, vinden wij het relevanter om zonder heparine te testen. Het kan echter zijn dat het bloedverlies zonder heparine niet voldoende is. Daarom willen we het model in deze Pilot zowel met als zonder heparine testen.

Als primaire uitkomsten zal de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies worden bepaald. Het model waarbij een dusdanige bloeding optreedt, zodat we het product voldoende kunnen testen, zonder dat het dier lijdt aan teveel bloedverlies, zullen wij in de vervolgexperimenten gaan gebruiken.

b. *Veiligheid en effectiviteit*

Groep 1: [REDACTED] (huidige 'gouden standaard')

Groep 2: [REDACTED] (experimentele groep)

Groep 3: [REDACTED] (extra vergelijking)

Groep 4: kale collageenspons (negatieve controle)

Groep 5: [REDACTED], eventueel 2e prototype

Toelichting: We gebruiken in groep 1 een 'fibrinogeenspons' [REDACTED] omdat deze geldt als de huidige standaard. Daarnaast willen we vergelijken met een andere NHS-gecoate collageenspons [REDACTED] met PEG-NHS; groep 3) om de aanvullende waarde van de [REDACTED] formule boven de PEG-NHS formule te bepalen. In groep 4 gebruiken we kale collageensponzen om de aanvullende waarde van de polymeer coating te onderzoeken.

Het is de bedoeling om alleen het best werkende prototype van [REDACTED] in varkens te testen. Het kan zijn dat we ook een tweede prototype willen onderzoeken, omdat de experimenten in deel 1 geen uitsluitsel konden geven, of omdat andere relevante factoren mee spelen. Denk hierbij aan de mogelijkheid dat het ene prototype iets beter werkt, maar het andere bijvoorbeeld makkelijker te produceren is.

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

Tabel 1- Overzicht experimentele opzet

	n=	Dag 0	Dag 1	Dag 3	Week 1	Week 2	Week 4	Week 8	Week 12
a. Pilot	2	Laparotomie met Hemostase model	Laparoscopie + opofferen						
b. Experiment	4	Laparotomie met Hemostase model	Laparoscopie		Opofferen				
	4			Laparoscopie		Opofferen			
	4				(Laparoscopie)		Opofferen		
	4						(Laparoscopie)	Opofferen	
	4							(Laparoscopie)	Opofferen

Hemostasemodel

Onder algehele narcose (zie protocol onder H3) zal er een laparotomie worden verricht. Daarbij zullen zowel op de milt als op de lever 8-10 laesies (afhankelijk van orgaangrootte) van 1cm diameter worden gemaakt. **Omdat elke laesie meteen behandeld wordt met een patch, de laesies kort achter elkaar worden gemaakt, en de lever en milt parenchymatueze organen zijn waarbij de bloedingen weinig afhankelijk van bloeddrukwisselingen (als gevolg van eerder bloedverlies) zijn, verwachten we niet dat het opgetreden bloedverlies van de eerste laesies van invloed is op de laatst gemaakte laesies. Ook bij het bijgewoonde experiment in [REDACTED] was dit niet het geval. Uiteraard zal dit in het pilot experiment worden gecontroleerd. We verwachten dat het bloedverlies van de laesies onderling wel zal verschillen doordat de onderliggende vaatanatomie per laesie anders is. Dit wordt ondervangen door de patches gerandomiseerd aan te brengen op de laesies.**

We overwogen drie methodes voor het aanbrengen van de laesies:

- handboor met schuurkop: beschreven in literatuur, maar bij voorbereidende proeven op varkenslevers is gebleken dat er hierbij veel druk gezet moet worden, waardoor er in plaats van een schaaf-/snijlaesie soms eerder een scheurlaesie ontstaat.
- biopsiepunch van 10mm met uitsnijden/knippen op 2-3mm diepte: snel en effectief, maar niet beschreven in literatuur.

- uitsnijden van kapsel met behulp van mes en mal. Deze methode wordt gebruikt door [REDACTED]
[REDACTED] De techniek lijkt geschikt maar is nog niet beschreven in de literatuur.

In de pilot zullen we bovenstaande methodes zelf proberen, waarna we de meest geschikte zullen gaan gebruiken.

De bloeding die vervolgens ontstaat zal kort met gazen worden getamponeerd en daarna zal er gerandomiseerd één van de verschillende patches (à 3x3cm) worden aangebracht. Vervolgens zullen de primaire uitkomsten van dit experiment worden bepaald:

- tijd tot hemostase (beoordeeld door 2 observeerders)
- bloedverlies per laesie (wegen van gazen die worden gebruikt voor afdeppen van overtollig bloed). Daarna zullen de laesies worden geobserveerd tot 5 minuten nadat hemostase is bereikt. Hierna zal de buik worden gesloten.

Laparoscopie

Tussen de eerste operatie en het opofferen zal er een tussentijdse laparoscopie onder algehele narcose (protocol zie H3) worden verricht (zie Tabel 1). De doelen hiervan zijn:

- Controleren van de laesies op nabloedingen
- Inspecteren van de toestand van de patches en aanwezigheid van verklevingen
- Verkrijgen van samples (patch+onderliggend orgaanweefsel) voor histologisch onderzoek (van elk type patch zal er één patch worden verwijderd)
- Bepalen van laparoscopische toepasbaarheid van [REDACTED] Hiervoor zal gebruik worden gemaakt van de bloeding die is ontstaan bij het verkrijgen van de samples voor histologisch onderzoek. (Mocht dit lastig blijken met [REDACTED] dan zullen we conventionele methodes gebruiken (gazen, electrocoagulatie, [REDACTED]) om hemostase te bereiken. Omdat het nog steeds om bloedingslaesie met bescheiden afmetingen gaat, verwachten we geen problemen hierbij.)

Opofferen

Op verschillende momenten (zie tabel 1) zullen de dieren worden opgeofferd. Hierbij zal er eerst onder algehele narcose (zie protocol onder H3) een laparotomie worden verricht waarbij alle laesies en patches zullen worden geïnspecteerd op afbraakstadium, ontstekingsreacties, abcesvorming, orgaanschade/fibrosing en verklevingen. Omdat de afbraaksnelheid van kale collageensponzen rond de 2 maanden ligt, en we een vergelijkbare afbraaksnelheid verwachten, zullen we een follow-up tot en met 3 maanden gebruiken. Aan het eind van de laparotomie zullen er enkele aanvullende 'hoog risico' bloedingen worden gemaakt omdat we het gebruik van [REDACTED] hiervoor willen testen. Dit betreft o.a. bloedingen van grote vaten (liesslagaders, aorta), maar ook zullen grotere letsels worden gemaakt van de milt, de nieren en de sacrale veneuze plexus, ter voorbereiding op dierproef 3.4.4.4. Aan het eind van de procedure zullen de dieren gedood worden met een overdosis pentobarbital.

Algemeen

Bij elke procedure (laparotomie, laparoscopie en opofferen) zal er ook bloed worden afgenomen voor analyse van de stollingsstatus, bloedwaarde en ontstekingswaarden.

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

Door zowel de lever als milt te gebruiken en op elk orgaan meerdere laesies te maken, worden zoveel mogelijk samples per dier getest. Door gebruik te maken van tussentijdse inspectie met behulp van laparoscopie hoeven er minder grote groepen gebruikt te worden voor het verkrijgen van informatie op de verschillende tijdstippen. Omdat we bij de laparoscopiën ook meteen de laparoscopische toepassing van [REDACTED] testen, hoeven ook

hier geen extra dieren voor te worden gebruikt. Tenslotte zullen vlak voor opoffering de hoogrisico bloedingen worden getest, zodat elk dier optimaal wordt gebruikt en hier ook geen extra dieren voor nodig zijn.

De voorlopige berekening voor het benodigde aantal testen per sample is verwerkt in onderdeel B1.

B. The animals

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

Soort: Varken

Ras: Z- of Z/N-lijn varkens

Geslacht: Vrouwelijk, omdat hier de meeste ervaring mee is binnen [REDACTED] en deze makkelijker te handelen zijn. We verwachten niet dat geslacht een significante invloed heeft, maar willen de groepen liefst zoveel mogelijk gelijk houden.

Leeftijd: volwassen, ouder dan 10 weken.

Gewicht: tussen 30 en 80kg. **Eerdere hemostase experimenten zijn uitgevoerd met varkens vanaf 30kg (Lewis, ISRN Surgery 2014). Het bijgewoonde experiment in [REDACTED] werd uitgevoerd met een varken van 40kg. De levergrootte was daarbij geschikt voor het uitvoeren van de experimenten. In [REDACTED] wordt vooral gewerkt met varkens tussen 40 en 80kg. We kiezen ervoor om geen gebruik te maken van varkens die uitgegroeid zijn, omdat deze met een gewicht tussen de 120 en 200kg zeer moeilijk te hanteren zijn. Voor zover bekend verandert de bloedstolling nauwelijks vanaf de geboorte en is er dus geen reden om oudere dieren te gebruiken.**

Geschatte aantallen

a. Pilot

Aantal dieren: 2

Toelichting: omdat we ook met *ex vivo* proeven hebben geoefend, en we meerdere laesies per dier maken, verwachten we niet meer dan 1 dier nodig te hebben om het model te testen. Echter, omdat we het model eventueel in een gehepariniseerd varken willen testen, zullen we mogelijk twee dieren gebruiken.

b. Veiligheid en Effectiviteit

Aantal dieren: 20

De benodigde groepsgrootte voor het vergelijken van de hemostase resultaten zal deels afhangen van het pilot deel en van dierproef 3.4.4.1.

De groepen zijn:

Groep 1: [REDACTED] (huidige 'gouden standaard')

Groep 2: [REDACTED] (experimentele groep)

Groep 3: [REDACTED] (extra vergelijking)

Groep 4: kale collageenspons (negatieve controle)

Groep 5: [REDACTED], eventueel 2e prototype

De benodigde sample size zal worden berekend om te bepalen of het [REDACTED]-eindproduct (groep 2) zorgt voor een significant snellere hemostase ten opzichte van de huidige standaard (groep 1). Omdat daarnaast ook zal worden vergeleken met groep 3, wordt er een Bonferroni correctie toegepast voor 3 vergelijkingen. Omdat groep 4 enkel wordt gebruikt als negatieve controle, zal hiervoor niet worden gecorrigeerd. Ook als er een tweede prototype van [REDACTED] wordt gebruikt zal er niet verder worden gecorrigeerd voor de mogelijke extra vergelijkingen, omdat de vergelijking met de gouden standaard de belangrijkste blijft. Bij het totaal benodigde aantal dieren is al wel rekening gehouden met groep 5.

De 5 materialen worden gerandomiseerd per laesie. Er wordt gebruik gemaakt van blokrandomisatie, dus per dier wordt elk materiaal twee keer gebruikt

Lever- en miltletsels lijken erg op elkaar, maar zijn niet direct te vergelijken. Daarom is de sample size voor beide groepen apart berekend.

Met behulp van de sample size calculator op <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html> zal voor het experiment een powerberekening worden gemaakt.

Geschatte sample size per groep: 38 laesies
Totaal aantal voor 5 groepen: 190 leverlaesies en 190 miltlaesies

Uitgaande van gemiddeld 10 leverlaesies en 10 miltlaesies per dier zijn er hiervoor 19 varkens nodig. Rekening houdend met uitval schatten we het benodigde aantal dieren initieel op 20.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Varken, Z of Z/N-lijn varkens	Registerd EU breeder	22	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

In de ontwikkelingsfase van [REDACTED] is gebruikt gemaakt van *ex vivo* experimenten om de effectiviteit van verschillende prototypen te onderzoeken. Hierdoor kon het gebruik van dierproeven voor het betreffende onderzoek vermeden worden. Ook is het 'leverschade-model' getest op varkenslevers, om de kans op onvoorziene omstandigheden te verminderen.

Bij een orgaanbloeding en het aanbrengen van lichaamsvreemd materiaal spelen vele factoren (bloeddruk, stollingscascade, immuunreacties) een rol. Het is nog onmogelijk om deze complexe processen samen te simuleren in een *in vitro* model.

Vermindering

Door gebruik te maken van pilotstudies, door het project te verdelen in meerdere stadia, en door gebruik te maken van groepsgrootte berekeningen voor elk experiment, proberen we het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden. Daarnaast beperken we de aantallen door elk dier optimaal te gebruiken (meerdere samples per dier, tussentijdse laparoscopie, hoogrisico testen bij opoffering).

Verfijning

De operaties worden uitgevoerd met aseptische technieken om de kans op exogene infectieuze complicaties te verminderen en worden gedaan door ervaren (laparoscopische) chirurgen. Door het toepassen van tussentijdse laparoscopie, in plaats van laparotomie, beperken we het ongerief van de tussentijdse operatie. Ook proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren tijdens en na de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumain lijden te minimaliseren (zie kopje humane eindpunten). Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten.

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

Verwerkt in D3.1

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

NVT

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

De anesthesie en analgesie wordt in samenspraak met de dierenarts en de geldende protocollen binnen het CDL toegepast.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Voorafgaand aan de operatie zullen de dieren geringe stress ondervinden van de inleiding van de operaties. De varkens zullen eerst licht gesedeerd worden om deze stress te beperken. Na de buikoperaties is er sprake van een herstelperiode van ongeveer 2-3 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Na de laparoscopische operaties zal dit minder zijn dan bij de open buikoperaties. Om de pijn te beperken wordt er in de postoperatieve fase pijnstilling gegeven.

Omdat er tijdens de operatie orgaanletsels worden aangebracht, bestaat er een theoretische kans op een nabloedingen. We schatten deze kans in als zeer laag (<5%), omdat de operatie pas wordt beëindigd als er adequate stolling is opgetreden. Mocht er toch een nabloeding ontstaan, dan zou dit kunnen resulteren in buikpijn en darmobstructie (door stoppen van peristaltiek), en bij ernstig bloedverlies kan het dier in shock raken of overlijden.

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt in antwoord onder I.1.

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

Verwerkt in antwoord onder I.1.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een sterk verslechterde conditie.

Bij varkens wordt gelet op lichaamsgewichts, koorts, apathisch gedrag, slechte voeropname. In geval van verslechterde conditie, zoals niet meer overeind kunnen komen of niet meer zelfstandig kunnen eten of drinken, wordt contact opgenomen met de dierenarts om te overleggen over verder beleid (behandeling of uit experiment halen).

Indicate the likely incidence.

Wij schatten in dat de kans op het behalen van het humane eindpunt minder dan 5% is.

K. Classification of severity of procedures

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

Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als matig, en wordt met name gevormd door het herstel van de buikoperatie.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van [REDACTED] en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als het lever/huidweefsel van de varkens nodig voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden opgeofferd.

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

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

| ☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure 3.4.4.3 Afbraak en langetermijneffecten rat

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

De doelen van dit onderdeel zijn:

- bepalen afbraaksnelheid
- bepalen afbraakreacties en langetermijneffecten

Experimentele opzet

Groepen 1a/b/c/d: aanbrengen █████ op lever, in buikholte en subcutaan;
opoffering respectievelijk na 2/4/8/12 weken

De belangrijkste uitkomsten waar we in dit onderdeel naar zullen kijken zijn: de afbraaksnelheid van █████ (macroscopische evaluatie/histologie/bloedtesten), het optreden van ontstekingsreacties (histologie/bloedwaarden), erodering van weefsel (macroscopisch en microscopisch), en het ontstaan van verklevingen aan █████. Daarnaast wordt gekeken naar aanwezigheid van productbestanddelen in o.a. orgaanweefsel (lever/nier) en plasma (allen te verkrijgen bij opoffering).

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

Experimentele handelingen

Conform dierproef 3.4.4.1 zullen er bij elke rat onder gasanesthesie (isofluraan) twee leverlaesies worden gemaakt waarop █████ wordt aangebracht. Daarnaast zullen er nog twee stukken caudaal in de buikholte worden achtergelaten en zal er ook links en rechts op de rug subcutaan een stuk █████ worden geplaatst. Het gebruik van meerdere stukken █████ levert meer informatie op per dier. Omdat er een kans bestaat dat de █████ in de toekomst ook op andere buikorganen en de huid gebruikt zou kunnen worden, is het relevant om dit ook te bestuderen. Na hechten van de buik en huidwonden, zullen de dieren na 2, 4, 8 en 12 weken worden opgeofferd. Hiertoe zullen de dieren een relaparotomie ondergaan, gevolgd door een inspectie van de buikholte en subcutane locaties waar █████ is achtergelaten. Hierna zullen de dieren worden gedood door verbloeding en cervicale dislocatie. Voor het kiezen van de juiste opoffermomenten is er gekeken naar de afbraaksnelheid van kale collageensponsen (gemiddeld 8 weken), zodat in dit experiment niet onnodig veel groepen hoeven te worden gebruikt.

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

Per experiment zal er een weloverwogen berekening of beredenering worden gedaan voor het bepalen van de groepsgrootte. Daarbij maken we gebruik van de *sample size calculator* op <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions>.

Geschatte aantallen

Aantal groepen: 4

Gemiddelde n per groep: 10

Subtotaal aantal dieren: 40

Toelichting: er worden vier opoffermomenten en daarom vier groepen gebruikt. Het aantal benodigde groepen en dieren in dit onderdeel zal gedeeltelijk afhangen van de uitkomsten van onderdeel 3.4.4.1 en 3.4.4.2. In die onderdelen zullen we al een eerste indicatie krijgen van de weefselreacties en eventuele afbraak na 1 week. Aan de hand daarvan kunnen we het benodigde aantal dieren voor dit onderdeel beter bepalen. We verwachten dat de afbraaksnelheid deels af zal hangen van het bloedverlies, maar dat de spreiding niet groot zal zijn. Derhalve verwachten we dat een groepsgrootte van 10 dieren voldoende proportionele waarde zal geven om het afbraakpercentage op de verschillende tijdstippen te bepalen.

B. The animals

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

Soort: Rat

Ras: Wu (Wistar)

Geslacht: beide

Leeftijd: adult

Herkomst: registered EU breeder

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat, Wistar	Registered EU breeder	40	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging& vermindering

Voor het kiezen van de juiste opoffermomenten is er gekeken naar de afbraaksnelheid van kale collageensponsen (gemiddeld 8 weken), zodat in dit experiment niet onnodig veel groepen hoeven te worden gebruikt. Er is nagedacht om de spons radioactief te labelen om de afbraaksnelheid te meten. Echter we voorzien dat deze ingewikkelde labeling techniekpas over een aantal jaren beschikbaar is en op zich geen vermindering van dieren zal geven .

Er is gezocht naar de mogelijkheid om zonder dierproeven de afbraak van lichaamsvreemd materiaal in de buikholte te bestuderen, maar hier werden geen adequate modellen voor gevonden.

Verfijning

Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten. Daarbij maken we gebruik van maatregelen om de kans op bias te verminderen (randomisatie, blinding) en doen we de operaties met aseptische technieken om de kans op infectieuze complicaties van buitenaf te verminderen. Tenslotte proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. De dieren worden gehuisvest volgens vigerende protocollen. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren aan het eind van de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumain lijden te minimaliseren (zie sectie J. Humane eindpunten).

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

Verwerkt in sectie D.1.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

NVT

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Voor (gas)anesthesie wordt gebruikt gemaakt van isofluraan.

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van buprenorphine

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Na een buikoperatie is er altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er tot 48 uur na de operatie pijnstilling gegeven. Indien nodig wordt het voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst en wordt de voeding verweekt om het eten en drinken te vergemakkelijken. **Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.**

In de groepen waar we kijken naar langetermijneffecten en afbraaksnelheid kunnen er op den duur mogelijk andere complicaties ontstaan, zoals ontstekingsreacties met buikpijn, of darmobstructie door verklevingen. De kans hierop is moeilijk te voorspellen.

Alle dieren worden elke dag geobserveerd. Indien de klinische conditie hiertoe aanleiding geeft, zullen die dieren vaker worden geobserveerd en, om onnodig lijden te voorkomen, tijdig uit het experiment worden gehaald als een humaan eindpunt wordt bereikt (zie sectie J.).

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt onder I.1

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

Verwerkt onder I.1

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een sterk verslechterde conditie, veroorzaakt door eventuele ontstekingsreacties of darmobstructie, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. Ook bij een gewichtsverlies van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht, of een verlies van meer dan 15% binnen 2 dagen, wordt het humane eindpunt bereikt.

Indicate the likely incidence.

De kans op complicaties na een laparotomie bij de rat is zeer klein. Ook schatten we de kans op complicaties door het aanbrengen van [REDACTED] in als zeer beperkt. Derhalve verwachten we in deze lange termijn experimenten dat het percentage dieren dat het humane eindpunt haalt kleiner is dan 5%.

K. Classification of severity of procedures

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

We schatten het ongerief in als Matig, met name door het herstel van de buikoperatie en de beperkte kans op complicaties.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

☐ No

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

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van [REDACTED] en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als het lever/huidweefsel van de ratten nodig voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden opgeofferd.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 4	Type of animal procedure 3.4.4.4 Veiligheid bij contaminatie rat

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Het doel van dit onderdeel is:

- bepalen of gebruik van [REDACTED] veilig is in een gecontamineerde buikholte

Experimentele opzet

Groep 1: contaminatie buikholte (controle)

Groep 2: contaminatie buikholte met dezelfde hoeveelheid [REDACTED] als getest in 3.4.4.1

Groep 3: contaminatie buikholte met een dubbele hoeveelheid [REDACTED]

Belangrijkste uitkomsten is het verloop van infecties bij aanwezigheid van [REDACTED] (mortaliteit, hoeveelheid en grootte van abscessen/peritonitis). Secundair wordt gekeken naar ontstekingsparameters in plasma. Dit zijn ook in de kliniek de belangrijkste parameters aangezien deze gebruikt worden om de ernst van de infectie en het risico voor de patiënt weer te geven.

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

Experimentele handelingen Voor het bestuderen van de invloed van contaminatie zullen we gebruik maken van een model waarbij er bacteriën in de buikholte worden ingebracht. Het model betreft het 'Inoculatiemodel' waarbij een combinatie van fecale vezels en een bekende hoeveelheid van twee soorten bacteriën (*E.coli* en *B.fragilis*) in de buikholte wordt gespoten. Wij gebruiken dit model omdat dit goed te standaardiseren is en wij een ruime en recente ervaring mee hebben. [REDACTED]

[REDACTED]. Door dit algemeen geaccepteerde model (Erginel et al. TJTES 2014; Rosman et al. Eur.J.Surg 1999) te gebruiken hoeven geen extra dieren gebruikt te worden om de onderzoekers te trainen en een nieuw model op te zetten.

Bij dit model wordt er een uur na de initiële contaminatie een laparotomie gedaan onder algehele narcose (isofluraan, zie onder H voor details), waarbij de buik wordt gespoeld en het buikschot chirurgisch wordt verwijderd, om de gevolgen van de infectie te beperken. Afhankelijk van de groep, zal er bij deze laparotomie ook [REDACTED] in verschillende hoeveelheden worden ingebracht in de buikholte. Voor de duidelijkheid, hierbij wordt er dus geen lever- of miltletsel aangebracht. De dieren zullen worden opgeofferd op dag 5. Uit eerdere projecten is gebleken dat dit de optimale dag is om de gevolgen van de infectie te onderzoeken en om tegelijkertijd het ongerief van de dieren te beperken. Het opofferen zal gebeuren door de dieren opnieuw onder narcose (isofluraan zie H) te brengen, de huid- en buikwand te openen en de buik te inspecteren en scoren op abscessen en adhesies.

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

Allereerst hebben we het project verdeeld in verschillende stadia. Pas als uit de eerdere dierproeven blijkt dat [REDACTED] effectief en veilig is, zal er de contaminatie experimenten begonnen worden. Daarnaast zal er een weloverwogen berekening worden gedaan voor het bepalen van de groeps grootte. Omdat we met name proportionele uitkomstmaten gebruiken (mortaliteit, aantal abscessen), maken we gebruik van de *sample size calculator* op <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions> om een powerberekening te maken.

B. The animals

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

Soort: Rat
Ras: Wu (Wistar)
Geslacht: Beide
Leeftijd: adult
Herkomst: registered EU Breeder

Geschatte aantallen

Aantal groepen:	3
Gemiddelde n per groep:	15
Subtotaal:	45

Toelichting: Bij eerdere experimenten naar veiligheid bij contaminatie was de benodigde groeps grootte gemiddeld 15 ratten per groep. Dit betrof o.a. onderzoek naar anti-adhesie gels, en leverde adequate statistische bewijskracht. Daarom hebben we dit aantal ook gebruikt als schatting voor het benodigde aantal dieren voor het betreffende onderdeel.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat, Wistar	Registerd EU breeder	45	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

C. Re-use

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging& vermindering

Er is gezocht naar de mogelijkheid om zonder dierproeven de veiligheid bij contaminatie in de buikholte te bestuderen, maar hier werden geen adequate modellen voor gevonden. De ontstekings en genezingsprocessen die hierbij gepaard gaan zijn dermate complex dat er (nog) geen geschikte *in vitro* modellen hiervoor zijn. Dit experiment gaan we uiteraard pas uitvoeren indien de voorafgaande experimenten met succes zijn afgerond.

Verfijning

Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten. Daarbij maken we gebruik van maatregelen om de kans op bias te verminderen (randomisatie, blinding) en doen we de operaties met aseptische technieken om de kans op infectieuze complicaties van buitenaf te verminderen. Tenslotte proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. De dieren worden gehuisvest volgens vigerende protocollen. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren aan het eind van de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumain lijden te minimaliseren (zie sectie J. Humane eindpunten).

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

Verwerkt in sectie D.1.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

NVT

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Voor (gas)anesthesie wordt gebruikt gemaakt van isofluraan.

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van buprenorphine

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Na een buikoperatie is er altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er tot 48 uur na de operatie pijnstilling gegeven. Indien nodig wordt het voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst en wordt de voeding verweekt om het eten en drinken te vergemakkelijken. **Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.**

Door contaminatie van de buikholtte is er een grotere kans op infectieuze complicaties. Bij vrijwel alle dieren treden er kleine abcessen op. Uit ervaring weten we dat de ratten hier buikklachten aan ondervinden. Bij een deel van de dieren (10-30%) treedt er gegeneraliseerde peritonitis op, waarbij ernstige buikpijn, septische shock of overlijden kan optreden.

Alle dieren worden elke dag geobserveerd. Indien de klinische conditie hiertoe aanleiding geeft, zullen die dieren vaker worden geobserveerd en, om onnodig lijden te voorkomen, tijdig uit het experiment worden gehaald als een humaan eindpunt wordt bereikt (zie sectie J.).

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt onder I.1

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

Verwerkt onder I.1

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een sterk verslechterde conditie, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. Ook bij een gewichtsverlies van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht, of een verlies van meer dan 15% binnen 2 dagen, wordt het humane eindpunt bereikt.

Tijdens peritonitis experimenten die onze groep de laatste jaren heeft uitgevoerd, is gebleken dat een goede score voor het humane eindpunt erg lastig is op te stellen. Daarom is besloten dat onderzoekers samen met ervaren biotechnici de dieren beoordeelden. Dit heeft tijdens de laatste paar experimenten met dit model gezorgd voor een minimale onvoorziene sterfte. We zullen dit proces ook voor dit experiment volgen. Daarnaast zullen we ook de pain face index bijhouden. **Dit implementeren we omdat we willen weten of deze methode ons in de toekomst een betere maat kan geven voor het ongerief.**

Indicate the likely incidence.

Uit eerdere projecten blijkt dat de kans op het bereiken van het humane eindpunt in de contaminatiegroepen rond de 20% ligt.

K. Classification of severity of procedures

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

We het ongerief bij het grootste aantal dieren (70-90%) in als matig, en bij 10-30% als ernstig, als gevolg van buikvliesontsteking. Daarmee komt het cumulatief ongerief op ernstig.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Voor dit experiment is het nodig om aan het eind de buikholte te inspecteren op de aanwezigheid en grootte van abcessen en adhesies, de toestand van en de toestand van de organen. Hiervoor zullen de dieren opnieuw onder narcose worden gebracht (zie H). Daarnaast hebben we zowel bloed als organen nodig van deze ratten voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden geofferd.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 5	Type of animal procedure 3.4.4.5 Ernstige bloedingen varken

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Het doel van dit onderdeel is het bepalen van de effectiviteit van [REDACTED] bij de behandeling van hoog risicobloedingen, waaronder leverresecties met grotere oppervlakten, miltletsels, nierresecties, sacrale veneuze plexus letsels en slagaderlijke bloedingen.

Omdat orgaangrootte en bloedingsoppervlak hierbij een belangrijke rol speelt gebruiken we in dit onderdeel varkens. Ook hierbij kijken we primair naar het bereiken van hemostase en secundair naar tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies.

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

Onder algehele narcose (voor protocol zie H3) zal er een laparotomie worden verricht. Vervolgens zal er één voor één een orgaanbloeding worden gemaakt welke behandeld wordt met [REDACTED]. Hierbij is de primaire uitkomst het bereiken van hemostase. Secundair wordt gekeken naar de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies.

De orgaanletsels zullen worden gemaakt in een volgorde op basis van het verwachte bloedverlies, beginnend bij 'weinig' en eindigend met veel. Ook wordt gekeken naar de benaderbaarheid van het orgaan. Dit leidt tot de geplande volgorde van:

1. Lever: partiële resectie mediale leverkwab, zoals in klinische situatie
2. Milt: kapsel + parenchymletsel met mes (Freire, Taha et al. 2011)
3. Nier: onderpoolresectie
4. Veneuze plexus: nader te bepalen in 3.4.4.2
5. Grote arteriën: nader te bepalen 3.4.4.2 (naaldpunctie of longitudinale snede)

Aan de hand van de conditie van het dier (bloeddruk) tijdens de operaties, zal besloten worden welke letsels allemaal zullen worden gedaan.

Omdat de primaire uitkomst van dit onderdeel het bereiken van hemostase tijdens de operatie is, en het totale bloedverlies naar verwachting groot is, zullen de dieren aan het eind van de operatie worden gedood.

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

Door zoveel mogelijk bloedingslaesies per dier te onderzoeken, proberen we het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat dit onderdeel een 'haalbaarheidsstudie' betreft, en er geen groepen worden vergeleken, zal er geen sample size berekening worden gedaan voor vergelijkende statistiek. Het aantal dieren zal vooral worden gebaseerd op de bevindingen van onderdeel 3.4.4.2 en de daaruit voortvloeiende verwachting over de effectiviteit van [REDACTED] bij grote bloedingen.

B. The animals

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

Soort: Varken

Ras: Z- of Z/N-lijn varkens

Geslacht: Vrouwelijk, omdat hier de meeste ervaring mee is binnen [REDACTED] en deze makkelijker te handelen zijn. We verwachten niet dat geslacht een significante invloed heeft, maar willen de groepen liefst zoveel mogelijk gelijk houden.

Leeftijd: volwassen, ouder dan 10 weken

Gewicht: tussen 30 en 80kg. **Eerdere hemostase experimenten zijn uitgevoerd met varkens vanaf 30kg (Lewis, ISRN Surgery 2014). Het bijgewoonde experiment in [REDACTED] werd uitgevoerd met een varken van 40kg. De levergrootte was daarbij geschikt voor het uitvoeren van de experimenten. In [REDACTED] wordt vooral gewerkt met varkens tussen 40 en 80kg. We kiezen ervoor om geen gebruik te maken van varkens die uitgegroeid zijn, omdat deze met een gewicht tussen de 120 en 200kg zeer moeilijk te hanteren zijn. Voor zover bekend verandert de bloedstolling nauwelijks vanaf de geboorte en is er dus geen reden om oudere dieren te gebruiken.**

Geschatte aantal: 10 varkens

We schatten drie tot vijf operaties nodig te hebben om in te schatten of gebruik van [REDACTED] voor de verschillende toepassingen haalbaar is. Mochten we erachter komen dat dit niet het geval is, zetten we het experiment niet voort. Als dat wel het geval is schatten we in 10 operaties nodig te hebben om te bewijzen dat het gebruik van [REDACTED] ook daadwerkelijk geschikt en veilig is.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Varken, Z- of Z/N-lijn	registered EU breeder	10	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

In de ontwikkelingsfase van █████ is gebruikt gemaakt van ex vivo experimenten om de effectiviteit van verschillende prototypen te onderzoeken. Hierdoor kon het gebruik van dierproeven voor het betreffende onderzoek vermeden worden. Bij een orgaanbloeding en het aanbrengen van lichaamsvreemd materiaal spelen vele factoren (bloeddruk, stollingscascade, immuunreacties) een rol. Het is nog onmogelijk om deze complexe processen samen te simuleren in een in vitro model.

Vermindering

Door bij het opofferen in onderdeel 3.4.4.2 al de methodes voor dit onderdeel te oefenen hoeven hier geen extra dieren voor gebruikt te worden. Doordat we in 3.4.4.2 ook al beginnen met het testen van █████ kan mogelijk het aantal dieren voor dit onderdeel verminderd worden. Door zoveel mogelijk bloedingslaesies per dier te onderzoeken, proberen we het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden.

Verfijning

Door de dieren aan het eind van de operatie onder narcose te doden, besparen we de dieren het ongerief van het herstel van de operatie. Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten.

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

Verwerkt onder D.1

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

NVT

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

De anesthesie en analgesie wordt in samenspraak met de dierenarts en de geldende protocollen binnen [REDACTED] toegepast.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Voorafgaand aan de operatie zullen de dieren geringe stress ondervinden van de inleiding van de operaties, omdat ze uit hun leefomgeving worden gehaald en inleidingsmedicatie krijgen toegediend. De varkens zullen eerst licht gesedeerd worden om deze stress te beperken (zie protocol onder H3).

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt in antwoord onder I.1.

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

Verwerkt in antwoord onder I.1.

J. Humane endpoints

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

☒ No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

Dit is een terminaal experiment

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Dit is een terminaal experiment. Gezien de grote hoeveelheid bloedverlies, worden de dieren gedood en is geen andere optie mogelijk.

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

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

☒ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0012
2. Titel van het project: Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties
3. Titel van de NTS: Het gebruik van GAT-Patch om te zorgen voor snellere bloedstolling bij operaties.
4. Type aanvraag:
 - ☐ nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ☐ ontvangen door DEC: 21-07-2015
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken: 04-08-2015 en 14-10-2015
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van 13-08-2015 tot 22-09-2015 en van 14-10-2015 tot 24-11-2015
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag: 22-09-2015 en 24-11-2015
 - ☐ advies aan CCD: 14-12-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 13-08-2015
 - Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting:

 - 3.5 Het is niet de bedoeling dat hier het gemiddelde ongerief voor alle dieren wordt vermeld. De onderzoekers worden verzocht deze vraag te beantwoorden conform de richtlijnen van de CCD.
 - 4.3 De tweede zin is onvolledig.

Project Proposal:

-3.1 Uit de dierproeven blijkt dat er in sommige proeven ook infecties worden aangebracht, maar de rationale hiervoor wordt niet genoemd in de achtergrond.

-3.1 Hoe vaak komt verhoogd bloedverlies met de beschreven complicaties voor bij bv leverresectie en multitrauma bij gebruik van het product dat nu als gouden standaard fungeert in de kliniek? Bij onderdeel 3.3 wordt het verbeteren van de klinische uitkomst genoemd, terwijl dat hier onvoldoende is beschreven.

-3.1 Kunnen de onderzoekers, meer specifiek dan in de huidige eerste alinea, de omvang van het klinisch probleem beschrijven? Om wat voor soort operaties gaat het hier en hoe frequent zijn complicaties veroorzaakt door bloedverlies en nabloedingen? De onderzoekers worden verzocht referenties toe te voegen welke de problematiek duidelijk beschrijven.

-3.1 De onderzoekers zoeken een alternatief voor de huidige kostbare patches met materiaal van dierlijke en menselijke afkomst. Verwachten de onderzoekers de incidentie van ernstige complicaties vanwege verhoogd bloedverlies te kunnen verlagen door een betere hemostase met de nieuwe patches, of gaat het uitsluitend om het ontwikkelen van een goedkoper alternatief zonder dierlijke en menselijke materialen? In de huidige beschrijving van de achtergrond van deze aanvraag is onvoldoende toegelicht welke nadelen kleven aan het gebruik van een product met dierlijke en menselijke materialen.

-3.2 De onderzoekers worden verzocht hier alleen de eerste 3 zinnen en de alinea over de haalbaarheid te laten staan, en de rest van de tekst naar het onderdeel basic outline van de strategie (3.4.2) te verplaatsen en de hierin gegeven informatie over de achtergrond van het project te verplaatsen naar onderdeel 3.1. Onder 1.a staat een opmerking over het ontbreken van ervaring bij 'andere universitaire centra'. Waarom is dit relevant? Onder 1.b is de uitleg waarom de onderzoekers 6-12 prototypes willen testen niet voldoende (op welke manier verschillen de prototypes van elkaar waardoor deze allemaal in vivo getest moeten worden?), en blijven de criteria voor selectie van het meest geschikte prototype onvermeld.

-3.2 Bij de haalbaarheid wordt vermeld dat ██████████ vergelijkbare experimenten zullen worden uitgevoerd. Waarin verschillen de experimenten die ██████████ zullen plaatsvinden van de voorgestelde experimenten, en hoe wordt ervoor gezorgd dat er geen onnodige herhaling van onderzoek plaatsvindt?

-3.2 Wat kunnen de onderzoekers melden over de haalbaarheid van de experimenten met ratten?

-3.4.3 Bij de beschrijving van de verschillende dierproeven vermelden de onderzoekers nog meer selectiepunten en go/no go momenten. Zij worden verzocht deze (ook) hier te benoemen.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A1.

*Vanwege het verschil in afmeting van de lever kiezen de onderzoekers voor een rattenmodel in plaats van een muizenmodel. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven waarom de lever van een muis te klein is voor deze experimenten, of alleen uitleggen waarom de rat volgens de onderzoekers het meest geschikte model is?

*Waarom doen de onderzoekers zowel een biopsie als een naaldpunctie, terwijl zij al verwachten dat een naaldpunctie mogelijk te gering bloedverlies veroorzaakt?

*Welke hoeveelheid bloedverlies bedoelen de onderzoekers met teveel bloedverlies (laatste alinea onder 'a. Pilot hemostasemodel')?

*Onder 'b. prototypeselectie' ontbreekt een uitleg van de verschillen tussen de te testen prototypes waaruit blijkt dat zij alle 12 in vivo getest moeten worden. De huidige omschrijving is daarvoor onvoldoende (zie ook eerste vraag over onderdeel 3.2 van het project proposal). Het is onduidelijk naar welke subgroep de onderzoekers verwijzen in deze alinea. Wat is de functie van groep 1 in het prototype selectie experiment? De resultaten uit groepen 3-15 kunnen vergeleken worden met het referentieproduct (groep 2).

-DAP1, onderdeel A2

*Het meten van de lichaamstemperatuur (ten behoeve van het bepalen van humane eindpunten) ontbreekt.

-DAP1, onderdeel A3.

*Graag duidelijk opschrijven wat wordt bedoeld met subgroep (zie ook het laatste punt bij onderdeel A1).

*Is er bij het berekenen van de benodigde groepsgrootte voor onderdeel B rekening gehouden met het grote aantal benodigde vergelijkingen (zoals bij DAP-2 verwezen wordt naar een Bonferroni correctie)? De gebruikte aantallen zijn waarschijnlijk ontoereikend.

-DAP1, onderdeel B

*Het gegeven argument voor het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren is niet valide. Het uiteindelijke product zal ook in vrouwen gebruikt worden. Indien de onderzoekers bijvoorbeeld menen dat het aantal benodigde dieren door het gebruik van beide sexen toeneemt of dat er geen verschillen tussen mannen en vrouwen te verwachten zijn, dan dienen zij dit te beargumenteren.

*De commissie raadt het hergebruik van dieren afkomstig uit andere experimenten voor de pilot af, juist omdat de uitkomst van deze pilot de opzet van de andere experimenten bepaalt.

-DAP1, onderdeel D: De onderzoekers kunnen hier tevens vermelden dat het aantal proefdieren wordt beperkt door meerdere laesies per dier aan te brengen.

-DAP1, onderdeel H. De commissie adviseert hier alleen de middelen te noemen zonder concentraties en tijdspunten.

-DAP1, onderdeel I. De herstelperiode na een buikoperatie is langer dan 2 dagen. De onderzoekers kijken immers ook op dag 3 en dag 7 naar herstel van het weefsel.

-DAP2, onderdeel A1

*In AP1 worden leverbloedingen als belangrijkste toepassing genoemd, hetgeen reden is om laesies in de lever te onderzoeken. Dit komt niet overeen met de tekst in deze dierproef, waarin zowel lever- als miltlaesies worden onderzocht omdat ze klinisch relevant zijn. Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom laesies in de milt bij varkens wel klinisch relevant zijn maar bij ratten niet?

*De reden om deze proeven met een groot proefdier te doen is de klinisch relevante grootte van de orgaanlaesies. De aangebrachte laesies zijn echter klein (diameter van 1 cm). Kunnen de onderzoekers aangeven waarom zij dit toch klinisch relevant vinden?

*De 10 laesies worden elk als onafhankelijke laesie beschouwd. Is de 10e laesie werkelijk qua bloedingseigenschappen nog vergelijkbaar met de eerste laesie c.q. zijn de omstandigheden

waaronder deze laesies worden aangebracht (bijvoorbeeld ten gevolge van het ontstane bloedverlies uit de laesies 2 t/m 9) nog vergelijkbaar?

*Worden de 5 materialen gerandomiseerd toegepast op alle laesies, of wordt er per varken gerandomiseerd? Of wordt er slechts 1 materiaal per varken gebruikt? Hoe denken de onderzoekers er voor te kunnen zorgen dat vergelijkbare aantallen dieren (èn ook vergelijkbare aantallen laesies die met hetzelfde materiaal behandeld zijn) op de verschillende tijden worden gedood?

*Waarom vragen de onderzoekers dieren tussen de 30-80 kilo die 10 weken oud zijn, in plaats van volwassen dieren?

-DAP3-5

*De commissie heeft de eerste twee bijlagen besproken. Vanwege de vele gerezen vragen en omwille van de noodzaak ook andere agendapunten te behandelen, heeft zij besloten om u te verzoeken om deze te beantwoorden en daarnaast zelfstandig de overige bijlagen aan te passen in lijn met de opmerkingen en vragen over de eerste twee bijlagen. Bij de volgende bespreking van uw aangepaste projectaanvraag zal de commissie ook de andere bijlagen behandelen en eventueel nog vragen hierover stellen.

- Datum antwoord: 22-09-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.5 Het antwoord bij vraag 3.5 is veranderd conform de richtlijnen van de CCD:

Het ongerief bij de experimenten met de ratten kan als volgt ingedeeld worden: 11.5% terminaal, 85% matig en 3,5% ernstig. Bij de varkens is het ongerief ingeschat op 31% terminaal en 69% matig.

-4.3 De zin is aangepast: Op basis van literatuur en eigen ervaring zijn de rat en het varken het meest geschikt voor het huidige project. Om de uitkomsten van het onderzoek van bloedstollende sponzen te vertalen naar de mens is overeenkomst in de grootte van de organen belangrijk. Daarom worden varkens gebruikt.

Project Proposal:

-3.1 De rationale hierachter stond reeds vermeld, maar bij het betreffende onderdeel onder 3.2. Onder 3.1 stond enkel een algemene verwijzing. We hebben nu ook onder 3.1 het contaminatieonderdeel als volgt benoemd:

"In het huidige projectvoorstel gaan we verder met de volgende stap, waarin wordt onderzocht welke van de prototypes van [REDACTED] het beste functioneert als er een actieve bloeding is in de buikholte. Hierbij spelen factoren mee zoals bloeddruk, stolling, temperatuur, ademhalingsbewegingen, peristaltiek van darmen in de buurt en inflammatoire reacties door de aangebrachte schade. Hiervoor is het nodig om gebruik te maken van levende proefdieren. Daarnaast willen we onderzoeken hoe effectief [REDACTED] is in vergelijking met bestaande producten, hoe lang het in het lichaam aanwezig blijft en of het product ongewenste bijwerkingen heeft. Ook willen we bestuderen of het gebruik van [REDACTED] veilig is in een geïnfecteerde omgeving, omdat er bij buikoperaties sprake kan zijn van bacteriële contaminatie en infecties hardnekkiger kunnen verlopen als er vreemd lichaam [REDACTED]

materiaal aanwezig is. We hebben het project opgedeeld in verschillende onderdelen welke hieronder staan vermeld en die verder worden beschreven onder 3.4 Onderzoeksstrategie.

- 3.1 De volgende tekst is toegevoegd aan de achtergrond informatie:

"...met grote terughoudendheid gebruikt. Desondanks wordt er wereldwijd jaarlijks voor bijna 150 miljoen dollar aan ████████ verbruikt, wat neerkomt op zo'n 400.000 tot 1.000.000 stuks. Dit is een indicatie van de frequentie waarin 1 soort patch wordt gebruikt. ████████ wordt in de buikchirurgie vooral gebruikt bij leverresecties.

In totaal worden er wereldwijd per jaar ruim 250 miljoen chirurgische ingrepen gedaan, waarbij ernstige bloedingen kunnen optreden (Weiser et al, Lancet 2008). Ze worden onder andere vaker gezien bij operaties aan de lever en bij traumatische of chirurgische letsels van de milt. Het aantal leverresecties is moeilijk te bepalen, maar gezien de wereldwijde incidentie van primaire leverkanker (rond 1 miljoen) en leveruitzaaiingen van borst-, long- of darmkanker (>1 miljoen), wordt het aantal hoog ingeschat (cancer.org). Bij leverresecties varieert het bloedverlies van 500-2500ml, en heeft zo'n 25% van de patiënten bloedtransfusie nodig. Verder is fors bloedverlies vaak een reden om een kijkoperatie te converteren naar een open buik operatie, en is het in sommige studies geassocieerd met een mortaliteit van 23-46% (Romano et al., HPB Surgery 2012; Hilal et al. J Gastroint Surg 2011; Belghiti et al., JACS 2000).

Miltletsels worden gezien bij een kwart van de stompe buiktrauma's in traumaziekenhuizen, maar vaak is hier geen chirurgische behandeling voor nodig. Dit is wel het geval bij een chirurgisch letsel van de milt, wat onder andere kan optreden bij operaties aan maag, darmen, alveesklier en nier. Helaas worden miltbloedingen die tijdens de operatie behandeld worden vaak niet vermeld in wetenschappelijke publicaties maar het aantal wordt geschat 5-10%. Bij deze kleinere miltbloedingen worden hemostatische producten vrijwel altijd toegepast omdat andere technieken om deze miltbloeding te stoppen falen.

We hebben de achtergrond als volgt aangevuld vanwege het tweede deel van de vraag: "Verhoogd bloedverlies en nabloedingen zorgen voor ernstige complicaties zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden en dragen bij aan een langere operatie- en opnameduur.

"De theoretische voordelen van ████████ boven bestaande producten zijn een vermindering van het bloedverlies en de daaraan gerelateerde complicaties door:

1. Een betere hechting aan orgaan oppervlakten zodat het product beter op zijn plaats blijft en tegendruk kan geven bij een bloeding
2. Het vormen van een gel bij contact met bloed, waardoor de bloeding sneller stopt dan bij 'passieve' stolling.

Daarnaast is het een synthetisch product met een eenvoudiger productieproces, waardoor het uiteindelijke product 5 tot 10 maal goedkoper wordt dan bestaande producten. Omdat ████████ synthetische bestanddelen gebruikt om actieve stolling te bewerkstelligen is het bovendien niet nodig om gebruik te maken van bloeddonaties om humaan fibrinogeen en thrombine te verkrijgen, zoals bij bijvoorbeeld ████████ wel het geval is.

-3.2 De tekst is verplaatst.

De tekst over universitaire centra was toegevoegd om aan te geven dat ook in andere centra geen ervaring is met dit model en dus ook niet gebruik gemaakt kan worden van eventuele know-how. Om verwarring te voorkomen is deze tekst nu weggelaten.

In de komende maanden zullen een aantal prototypes geselecteerd worden op basis van in vitro testen. Verschillen tussen de prototypes zitten vooral in verhouding tussen de hoeveelheid OH en NHS groepen en de dichtheid waarmee het polymeer op de collageenspons wordt gezet. Verschil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen.

We hebben dit als volgt in de tekst toegevoegd:

b. Prototypeselectie en 'proof of principle'

Bepalen welk prototype van [REDACTED] het meest geschikt is met betrekking tot tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies en onderzoeken welke (vreemd lichaam) reacties deze veroorzaakt na aanbrengen op weefsel. De prototypes verschillen in samenstelling en hoeveelheid van het actieve polymeer, waardoor zowel de effectiviteit als de interactie met lichaamsweefsel anders kunnen zijn.

Verskil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen. We verwachten op basis van ervaringen met verscheidene andere geteste biomaterialen dat de soort (vreemd lichaam) reactie in de rat representatief is voor de mens.

-3.2 Het centrum [REDACTED] is reeds bezocht. Daarom is de tekst als volgt aangepast:

" Binnen onze afdeling en [REDACTED] is er veel ervaring met buikoperaties bij ratten en varkens, dus ook veel ervaring met de benodigde zorg rondom de operaties. Daarom verwachten we geen problemen met de logistieke uitvoer van de experimenten. Er is nog weinig ervaring met de geplande diermodellen voor het gebruik van hemostatische patches. Om die reden hebben we zowel voor het rattenmodel als het varkensmodel pilotexperimenten ingebouwd om de modellen te oefenen en valideren. Op basis van onze ruime ervaring met buikoperaties bij ratten en voorbereidende testen met dode ratten, schatten we in dat de rattenexperimenten goed haalbaar zijn.

Er is een centrum [REDACTED] bezocht om mee te kijken bij een varkensmodel voor hemostase. In [REDACTED] worden kale collageensporen gemaakt en op verkennende wijze getest. Door mee te kijken met het model bij een varken hebben we een goede indruk gekregen van de uitvoering en haalbaarheid van de proef. Wel denken we dat het nog nodig is om pilotstudies te doen om de geplande diermodellen te oefenen en intern te valideren. Uit onze contacten met [REDACTED] weten we dat ons gepland onderzoek geen onnodige herhaling is. Bovendien is het onderzoek in [REDACTED] 'marketing driven' en worden experimenten daar niet met een wetenschappelijke vraagstelling uitgevoerd.

-3.4.3 De volgende tekst uit de beschrijving van de dierproeven is toegevoegd aan dit deel van het project proposal:

In het pilot deel van dierproef 1 zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen te groot is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest. Verder

worden in onderdeel b van dierproef 1 eerst de subgroepen gedaan met opoffering op dag 1. Zo kan al een goede eerste indruk worden verkregen van de effectiviteit en weefselreacties. Als het prototype goed lijkt te functioneren en nog terug te vinden is op de laesie, zullen ook de experimenten met de andere subgroepen uitgevoerd worden.

Als uit de experimenten in dierproef 1 blijkt dat het coaten van de collageenspons leidt tot een verbeterde effectiviteit en er geen grote complicaties (zoals forse ontstekingsreacties of abcesvorming) optreden, dan zal het beste [REDACTED] prototype worden uitgekozen en zal hiermee verder worden gegaan in dierproef 2. Als uit dierproef 2 blijkt dat [REDACTED] ook in een groot proefdier werkt en qua effectiviteit minimaal gelijkwaardig is aan bestaande producten, zullen we verder gaan met dierproef 3 en 5. De contaminatie experimenten in dierproef 4 zullen pas worden gestart nadat de lange termijn effecten in dierproef 3 zijn onderzocht en hierbij geen ernstige complicaties zijn opgetreden.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A1.

*Bij het gebruik van een hemostatische patch kiezen we voor een overlap van minimaal 1 cm rondom de leasie/bloeding wat 50% is van wat aangehouden wordt bij mensen. Bij een kleinere overlap is de vertaalslag naar mensen onzeker. 1 cm overlap wil zeggen dat de stukken patch minimaal 2 bij 2 cm moeten zijn en dit stuk op een toegankelijk stuk leverlob moet worden gepositioneerd. Een muizenlever is hiervoor te klein. We hebben dit in de tekst als volgt aangepast:

De redenen dat we voor een rattenmodel met leverbloeding hebben gekozen zijn:

- Het bereiken van hemostase van leverbloedingen is de belangrijkste toepassing van [REDACTED]. Daarom gebruiken we bijvoorbeeld geen milt-, of nierletsels. Bovendien zijn milt en nier bij ratten dermate klein dat er onvoldoende ruimte is om de patch met een adequate marge rondom een bloeding te positioneren. Het gebruik van miltletsels zal onderzocht worden met een varkensmodel in dierproef 3.4.4.2. Onderzoek van miltletsel is klinisch relevant omdat de milt het meest voorkomende orgaan is dat wordt beschadigd bij een stom buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval)
- Onze afdeling heeft het meeste ervaring met buikoperaties bij ratten.
- Uit ex vivo proeven is gebleken dat de afmeting van een rattenlever geschikt is voor het aanbrengen van kleine stukjes [REDACTED]. Bij gebruik van muizenlevers zouden de afmetingen van [REDACTED] teveel moeten worden verkleind zodat er onvoldoende overlap van de patch rondom de bloeding is en er daardoor te weinig ruimte is voor de relatief te grote patch goed te positioneren.
- Omdat het doel van dit onderdeel is om de effectiviteit en weefselreacties van de prototypes te verkennen, en niet om de resultaten direct te vertalen naar de mens, verkiezen we in dit onderdeel de praktische kant van een klein proefdier boven de translationele waarde van grote proefdieren (varkens).

*Dit is een pilot experiment om de beste methode voor de overige dierproeven te onderzoeken. Zoals we een stukje verderop in de tekst hadden beschreven, maken we alleen gebruik van de naaldpunctie in het geval dat de overige twee methoden niet voldoen:

In het pilot deel zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen teveel is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest.

Ter verduidelijking is de volgende tekst toegevoegd:

De methodes om de bloeding te induceren die we zullen testen zijn:

1. Verwijderen stukje lever. Lijkt meer op kliniek bij leverresecties en waarschijnlijk voldoende bloedverlies, maar moeilijk om te standaardiseren (Schmiedt, Köhler et al. 2012)
2. Biopsie laesie. Goed te standaardiseren en praktische grootte van bloeding, maar niet eerder beschreven in literatuur.

We beginnen eerst met deze twee methoden, mocht blijken dat er te toch teveel bloedverlies ontstaat, dan testen we de volgende:

3. Naaldpunctie. Goed te standaardiseren, klinisch relevant voor een peroperatieve naald biopsie van de lever bij diagnostiek naar diepe leverafwijkingen en tumoren, mogelijk gering bloedverlies. (Murakami, Yokoyama et al. 2008)

*De alinea is als volgt aangepast:

"Elke groep in de pilot zal worden onderverdeeld in de volgende subgroepen:

a: aanbrengen van kale collageensponzen (negatieve controle)

b: aanbrengen van [REDACTED] ('positieve' controle).

Als primaire uitkomsten zal de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies worden bepaald. Het model waarbij een dusdanige bloeding optreedt zodat we het product voldoende kunnen testen, zonder dat het dier lijdt aan te veel bloedverlies (>1.5mL of >10% van circulerend volume), zullen wij in vervolgexperimenten gaan gebruiken.

*Uitleg over de verschillen tussen de prototypes is hierboven weergegeven. De functie van groep 1 is om de hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te kunnen bepalen. Verder hebben de subgroepen een duidelijke naam gekregen en zijn als volgt weergegeven:

Afhankelijk van de pilot resultaten zal de meest geschikte 'leverletsel-methode' in deze experimenten worden gebruikt. Per groep zal er een verschillend prototype van [REDACTED] of een controleproduct worden getest. De primaire uitkomsten zijn de hoeveelheid bloedverlies en de tijd tot het bereiken van hemostase. Na het bereiken van hemostase zal de buik worden gesloten. Als secundaire uitkomst zal worden gekeken naar de weefselreacties op korte termijn met behulp van beschrijvende histologie. De dieren zullen op dag 1, 3 of 7 (subgroep a,b,c) worden opgeofferd en na inspectie van de buikholte op eventuele nabloedingen zal er weefsel worden afgenomen.

Groep 1 (a,b,c): controle met gazen, om hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te bepalen (negatieve controle)

Groep 2 (a,b,c): controle met [REDACTED] h, als referentieproduct^

Groep 3 (a,b,c): controle met kale collageenspons, om meerwaarde van polymeren te bepalen

Groep 4 (a,b,c) - 15 (a,b,c): [REDACTED]

Specifieke invulling van prototypes zullen nog nader worden bepaald. Verschillen tussen de prototypes zitten vooral in verhouding tussen de hoeveelheid OH en NHS groepen en de

dichtheid waarmee het polymeer op de collageenspons wordt gezet. Dit uit zich in de verschillende groepen in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, de mate van absorptie.

^Omdat [REDACTED] (huidige standaard) dikker is dan [REDACTED] en daarnaast minder flexibel en aanzienlijk duurder is, achten wij het minder geschikt om als controleproduct te gebruiken in dit rattenmodel. In dierproef 2 (varkensmodel) zal het wel gebruikt worden als controleproduct.

-DAP1, onderdeel A2

*Bij het bepalen van de humane eindpunten is lichaamstemperatuur niet noodzakelijk. Dit is te bepalen door andere kenmerken. De tekst bij DAP1 onderdeel J is aangepast.

-DAP1, onderdeel A3.

*De subgroepen zijn nu duidelijker weergegeven in zowel de projectproposals als de DAP's

*Er was ook in deze powerberekening gebruik gemaakt van een bonferroni-correctie, dit was echter niet weergegeven in de tekst. De tekst is als volgt aangepast:

De groepsgrootte zal door middel van een powerberekening worden bepaald. Daarbij zal gebruik gemaakt worden van sample size calculator op:

<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>.

De benodigde sample size zal worden berekend om te bepalen of het [REDACTED]-prototype (groep 4-15) zorgt voor een significant snellere hemostase ten opzichte van de huidige standaard (groep 2). Omdat daarnaast ook zal worden vergeleken met groep 3, wordt er een bonferroni correctie toegepast voor 3 vergelijkingen. Omdat groep 1 enkel wordt gebruikt als negatieve controle, zal hiervoor niet worden gecorrigeerd. Ook wordt er per prototype niet verder gecorrigeerd voor de mogelijke extra vergelijkingen, omdat de vergelijking met de gouden standaard de belangrijkste blijft.

-DAP1, onderdeel B

*De tekst is als volgt aangevuld:

"We zullen gebruik maken van mannelijke Wistar ratten omdat onze afdeling de meeste ervaring heeft met buikoperaties bij deze dieren, en er a priori geen reden of tegenstrijdige literatuur is om hiervan af te wijken. Het is bekend dat er verschillen zijn in SPONTANE bloedstolling tussen mannen en vrouwen, en dat geslachtshormonen hier een belangrijke rol bij spelen (Mendelsohn, Science 2005). Dit is met name relevant voor chronische atherosclerotische hart- en vaatziekten (meer arterieel vaatlijden bij mannen). Bij vrouwen is het risico op veneuze thrombose hoger (pilgebruik, roken) Er is geen verschil in de literatuur in het stollingsproces tussen man en vrouw bij ACUTE bloedingen. Tevens, omdat [REDACTED] werkt door middel van gelvorming van plasma-eiwitten die gelijk zijn bij man en vrouw, zijn eventuele kleine verschillen in de stollingscascade niet relevant. In deze fase, waarin we prototypes en producten onderling vergelijken, vinden we het vooral belangrijk dat de groepen zoveel mogelijk gelijk zijn. Bij de varkensexperimenten maken we gebruik van vrouwelijke varkens vanwege 'handling' van de dieren. Ook hier verwachten we geen sexe specifieke verschillen in stolling na chirurgisch geïnduceerde bloedingen.

*Alleen onder strikte omstandigheden hadden wij dieren willen hergebruiken. Echter, omdat de uitkomst van dit experiment de opzet van de volgende experimenten bepaald, en we hierin geen risico willen lopen, nemen we hier het advies van de commissie over en zullen geen gebruik maken van dieren uit eerdere studies. Het antwoord is veranderd bij DAP1 onderdeel C.

-DAP1, onderdeel D:

*De tekst is als volgt aangepast:

Vervanging& vermindering

In de ontwikkelingsfase van ██████ is gebruik gemaakt van in vitro en ex vivo experimenten (o.a. met bloed van mensen en ratten) om tientallen prototypes te testen en hun effectiviteit in te schatten. Daarmee is het gebruik van proefdieren voor dit doel vermeden. Omdat het algemeen functioneren van ██████ in dit onderdeel wordt gescreend, dient het tevens als pilot voor de rest van het project. Mochten er onverwachte complicaties of tegenvallende prestaties worden gezien, dan bespaart dit het gebruik van varkens en ratten in de volgende onderdelen. Verder wordt het aantal proefdieren beperkt doordat er meerdere laesies per dier worden aangebracht.

-DAP1, onderdeel H

*De tekst is aangepast:

Voor (gas)anesthesie wordt gebruikt gemaakt van isofluraan.

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van buprenorphine

-DAP1, onderdeel I.

*Het herstel van het weefsels is iets anders dan de klinische conditie van de rat, voor de duidelijkheid hebben we de tekst als volgt aangepast:

In experiment b is er na de buikoperatie altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er tot 48 uur na de operatie pijnstilling gegeven. Indien nodig wordt er (nat) voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst om het eten en drinken te vergemakkelijken. Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.

-DAP2, onderdeel A1

*In DAP1 is onderdeel A1 aangepast:

"De redenen dat we voor een rattenmodel met leverbloeding hebben gekozen zijn:

- Het bereiken van hemostase van leverbloedingen is de belangrijkste toepassing van ██████ Daarom gebruiken we in deze fase geen milt- of nierletsels." Bovendien zijn milt en nier bij ratten dermate klein dat er onvoldoende ruimte is om de patch met een adequate marge rondom een bloeding te positioneren. Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden met een varkensmodel in dierproef 3.4.4.2". Onderzoek van miltletsel is klinisch relevant omdat de milt het meest voorkomende orgaan is dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval)

In DAP2 onderdeel A1 is de tekst aangevuld:

- Door de grootte van de milt en lever van varkens kunnen er meerdere samples per dier worden getest. Met name de milt is erg lang bij varkens en daardoor zeer geschikt. Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden in dit model, omdat onderzoek van miltletsel klinisch relevant is: de milt is het meest voorkomende orgaan dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval) Het orgaanoppervlak van de milt lijkt bovendien erg veel op dat van andere solide organen, waaronder de lever. Door ook de varkensmilt te gebruiken kan er meer informatie worden verkregen en worden er zo weinig mogelijk dieren gebruikt.

*De tekst is als volgt aangevuld:

"De redenen dat we voor een varkensmodel met lever- en miltbloeding hebben gekozen zijn: - om te bepalen of bij mensen veilige hemostase kan worden bereikt is het nodig dit te testen op orgaanlaesies met een klinisch relevante grootte en anatomie en vergelijkbaar stollingsmechanisme; hiervoor zijn varkensorganen geschikt. Bij leveroperaties ontstaan er grote bloedende resectievlakken, die voor een groot deel met electrocoagulatie kunnen worden behandeld. Daarbij blijven er echter vaak enkele bloedende plekken over die een kleinere diameter (1-2cm) hebben, maar die wel hardnekkig kunnen blijven bloeden. Bij het behandelen van dergelijke laesies met een patch is er een niet bloedende marge van zo'n 1 cm rondom nodig. Rattenlevers zijn weer net te klein om patches van 3x3cm (overlap 1 cm bij defect 2 cm) goed te positioneren.

*De tekst is als volgt aangevuld:

Daarbij zullen zowel op de milt als op de lever 8-10 laesies (afhankelijk van orgaangrootte) van 1cm diameter worden gemaakt. Omdat elke laesie meteen behandeld wordt met een patch, de laesies kort achter elkaar worden gemaakt en de lever en milt parenchymatueze organen zijn waarbij de bloedingen weinig afhankelijk van bloeddrukwisselingen (als gevolg van eerder bloedverlies) zijn, verwachten we niet dat het opgetreden bloedverlies van de eerste laesies van invloed is op de laatst gemaakte laesies. Ook bij het bijgewoonde experiment [REDACTED] was dit niet het geval. Uiteraard zal dit in het pilot experiment worden gecontroleerd. We verwachten dat het bloedverlies van de laesies onderling wel zal verschillen doordat de onderliggende vaatanatomie per laesie anders is. Dit wordt ondervangen door de patches gerandomiseerd aan te brengen op de laesies.

*De 5 materialen worden gerandomiseerd per laesie. Er wordt gebruik gemaakt van blokrandomisatie, dus per dier wordt elk materiaal twee keer gebruikt. Dit hebben we toegevoegd aan de tekst.

*We hebben de tekst als volgt aangepast:

Gewicht: tussen 30 en 80kg. Eerdere hemostase experimenten zijn uitgevoerd met varkens vanaf 30kg (Lewis, ISRN Surgery 2014). Het bijgewoonde experiment [REDACTED] werd uitgevoerd met een varken van 40kg. De levergrootte was daarbij geschikt voor het uitvoeren van de experimenten. In [REDACTED] wordt vooral gewerkt met varkens tussen 40 en 80kg. We kiezen ervoor om geen gebruik te maken van varkens die uitgegroeid zijn, omdat deze met een gewicht tussen de 120 en 200kg zeer moeilijk te hanteren zijn. Voor zover bekend verandert de bloedstolling nauwelijks vanaf de geboorte en is er dus geen reden om oudere dieren te gebruiken.

*In lijn met de opmerkingen en vragen over de eerste twee experimenten hebben we ook de overige experimenten aangepast en aangevuld.

Hierbij willen we de commissie graag op de hoogte stellen dat er nog een onderzoeker (Edwin Roozen, artikel 9) is toegevoegd aan het project.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum: 21-10-2015
- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-In de beantwoording van de vraag over onderdeel 3.2, derde vraag stellen de onderzoekers dat zij twee zinnen hebben toegevoegd aan de projectaanvraag. De tweede zin (We zijn bij de in vitro testen...-...van deze 3 eigenschappen) ontbreekt in de projectaanvraag. Zij worden verzocht deze zin toe te voegen.

Description of Animal Procedures:

-Het is de commissie niet duidelijk wat de onderzoekers bedoelen bij de beantwoording van de vraag over DAP1, onderdeel B, eerste vraag. Als eventuele kleine verschillen in de stollingscascade niet relevant zijn, waarom willen de onderzoekers dan toch alleen mannelijke dieren gebruiken? Welke rol spelen de verschillen in spontane bloedstolling tussen mannen en vrouwen in het gehanteerde diemodel? De commissie verzoekt u deze paragraaf te herformuleren tot een coherente tekst met valide argumenten waaruit blijkt waarom de onderzoekers bij voorkeur mannelijke dieren gebruiken, of de verwijzingen naar mannelijke dieren te schrappen in DAP1, 3 en 4, onderdeel B.

-DAP3 en DAP5, A3: Voor het met een voldoende mate van zekerheid opsporen van complicaties die in 10% van de gevallen voorkomen zijn (veel) meer dieren nodig. De onderzoekers worden daarom verzocht de laatste zin te verwijderen.

-DAP4, A2: Waarom willen de onderzoekers dit model gebruiken om infectie in de buik te induceren? De commissie verzoekt u een referentie toe te voegen van uzelf en een andere onderzoeksgroep waarin dit model wordt gebruikt.

- Datum antwoord: 24-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-De tweede zin ontbrak inderdaad in de projectaanvraag, deze is nu toegevoegd aan het project:

Bepalen welk prototype van [REDACTED] het meest geschikt is met betrekking tot tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies en onderzoeken welke (vreemd lichaam) reacties deze veroorzaakt na aanbrengen op weefsel. De prototypes verschillen in samenstelling en hoeveelheid van het actieve polymeer, waardoor zowel de effectiviteit als de interactie met lichaamsweefsel anders kunnen zijn.

Verschil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen. We verwachten op basis van ervaringen met verscheidene andere geteste biomaterialen dat de soort (vreemd lichaam) reactie in de rat representatief is voor de mens.

Description of Animal Procedures:

-In DAP 4 maken we gebruik van een diermodel waarbij wij al veel ervaring hebben. Bij dit model hebben we altijd alleen mannelijke dieren gebruikt. Daardoor leek het ons zinvol ook bij de andere experimenten met de ratten alleen mannelijke dieren te gebruiken.

Er zijn op voorhand echter geen aanwijzingen dat er verschillen zijn tussen mannelijke en vrouwelijke ratten ten aanzien van de werking van de patch. Ook de extrinsieke stolling verschilt niet wezenlijk tussen mannetjes en vrouwtjes ratten. Daarom vervalt op voorhand het verzoek voor alleen mannetjes ratten. Mocht na het eerste experiment blijken dat een heroverweging van deze keuze noodzakelijk is omdat er onverwacht toch een verschil tussen mannelijke en vrouwelijke ratten optreedt, willen wij dit graag terugkoppelen aan de DEC/CCD en de rest van het experiment uitvoeren met ratten van 1 sexe. Dit bespaart uiteindelijk dieren.

In DAP1, 3 en 4 hebben we alle verwijzingen naar het gebruik van mannelijke dieren verwijderd.

-DAP3 en DAP5, A3:We nemen het advies van de commissie hier over en hebben in beide experimenten de zin verwijderd:

(DAP 3) Derhalve verwachten we dat

een groepsgrootte van 10 dieren voldoende proportionele waarde zal geven om het afbraakpercentage op de verschillende tijdstippen te bepalen.

(DAP 5) Als dat wel het geval is schatten we in 10 operaties nodig te hebben om te bewijzen dat het gebruik van [REDACTED] ook daadwerkelijk geschikt en veilig is.

- DAP4, A2: Wij hebben DAP4, A2 als volgt aangepast:

Voor het bestuderen van de invloed van contaminatie zullen we gebruik maken van een model waarbij er bacteriën in de buikholte worden ingebracht. Het model betreft het 'Inoculatiemodel' waarbij een combinatie van fecale vezels en een bekende hoeveelheid van twee soorten bacteriën (E.coli en B.fragilis) in de buikholte wordt gespoten. Wij gebruiken dit model omdat dit goed te standaardiseren is en wij een ruime en recente ervaring mee hebben. [REDACTED]

[REDACTED] Door dit algemeen geaccepteerde model (Erginel et al. TJTES 2014; Rosman et al. Eur.J.Surg 1999) te gebruiken hoeven geen extra dieren gebruikt te worden om de onderzoekers te trainen en een nieuw model op te zetten. Bij dit model wordt er een uur na de initiële contaminatie een laparotomie gedaan onder algehele narcose (isofluraan, zie onder H voor details), ...

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ☐ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk ‘onderzoeken of [REDACTED], een nieuwe, goedkope, grotendeels synthetische, hemostatische patch, effectief en veilig is voor bloedingen in de buikholte waarbij reguliere en eenvoudige behandelmethodes (hechting, electrocoagulatie) minder effectief of niet mogelijk zijn’. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken welke eigenschappen van [REDACTED] bijdragen aan goede bloedstelping in vivo, en of het meest geschikte prototype effectief en veilig is om aangebrachte laesies in ratten en varkens te behandelen. Ook wordt duidelijk of dit prototype goed wordt afgebroken, er geen nadelige effecten door het gebruik op de lange termijn ontstaan en of het gebruikt kan worden in omstandigheden waarbij contaminatie met bacteriën regelmatig voorkomt. Voorts wordt duidelijk of [REDACTED] geschikt is om grotere bloedingen te stoppen in varkens. Deze resultaten zullen bijdragen aan het ontwikkelen van een goedkopere hemostatische patch zonder humane of dierlijke producten voor gebruik bij patiënten. Dergelijke patches zijn belangrijk om aanzienlijk bloedverlies te voorkomen. Traumatische letsels van solide organen en andere structuren in de buik- en bekkenholte, en operaties waarbij ernstige bloedingen kunnen optreden, zoals leverresecties en miltoperaties, gaan vaak gepaard met veel bloedverlies. Verhoogd bloedverlies en nabloedingen dragen bij aan een langere operatie- en opnameduur, en kunnen voor ernstige complicaties zorgen, zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden. De onderzochte patch vormt mogelijk een goed alternatief zonder de nadelen (hoge kosten, niet-synthetisch) van het huidige product. De DEC vindt de kennis die wordt vergaard met dit onderzoek en het ontwikkelen van een dergelijke patch van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring met buikoperaties bij ratten, maar nog niet bij varkens. Ook is er nog geen ervaring met het gebruik van hemostatische patches. De benodigde ervaring wordt opgedaan door mee te kijken bij collega's die dergelijke operaties vaak uitvoeren, en door eerst pilotexperimenten uit te voeren. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het bloedstelpende effect van de onderzochte patches bij ratten en varkens, en over de veiligheid, de effecten op langere termijn, het gebruik bij infectiegevaar en het gebruik bij grote bloedingen. Door een aantal factoren ook bij varkens te testen, wordt de translationele waarde van het onderzoek vergroot.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de benodigde operaties en het daarmee gepaard gaande bloedverlies. Het ongerief als gevolg van de operaties onder terminale anesthesie is terminaal. De DEC schat het ongerief voor de ratten als gevolg van de benodigde subcutane

injecties, de bloedafnames, en de verdoving in als licht. Het ongerief als gevolg van de buikoperatie en de herstelperiode daarna, en de subcutane plaatsing van patches schat de commissie in als matig. De commissie is van mening dat het contaminatiemodel tot matig ongerief voor de meeste dieren leidt, en tot ernstig ongerief voor de dieren die een buikvliesontsteking ontwikkelen (ongeveer 20% van de dieren in dit experiment). Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als terminaal voor 11,5% van de dieren, matig voor 85% van de dieren en ernstig voor 3,5% van de dieren. De DEC schat het ongerief voor de varkens als gevolg van de buikoperatie en de herstelperiode daarna in als matig. Het ongerief als gevolg van de operaties onder terminale anesthesie is terminaal. Het cumulatief ongerief voor de varkens in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als terminaal voor 31% van de dieren en matig voor 69% van de dieren.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De onderdelen van het project die in vitro onderzocht kunnen worden zijn al afgerond. Voor beantwoording van de resterende vraagstelling zijn proefdiermodellen noodzakelijk. Reacties op een vreemd lichaam en de afbraak daarvan zijn alleen in dieren goed te bestuderen. Vanwege overeenkomsten in grootte van organen tussen varkens en mensen is het gebruikelijk om chirurgische methodes of materialen die bij operaties gebruikt worden te testen bij varkens alvorens toestemming te vragen voor een klinische trial met patiënten. De commissie is het eens met deze gang van zaken.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het uitvoeren van pilotexperimenten en de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De onderzoekers willen in de beginfase 12 verschillende prototypes uittesten. Gezien het aantal variabelen is de commissie van mening dat dit een redelijk aantal is om het beste prototype te kunnen selecteren. De aanvrager heeft het beschreven diermodel tot nu toe altijd uitgevoerd met mannelijke dieren. Om het fokoverschot te verminderen zal hij gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, aangezien hij op voorhand geen reden heeft om aan te nemen dat het geslacht van de dieren de werking van de patch wezenlijk zal beïnvloeden. Mocht na het eerste experiment blijken dat het geslacht (mogelijk) toch invloed heeft op de werking en dit een goede interpretatie van de resultaten verhindert, dan zal hij een met redenen omkleed verzoek tot het gebruik van dieren van één sexe indienen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 265 ratten en 32 varkens.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Voor de terminale experimenten is geen verdere verfijning mogelijk. Het contaminatiemodel gaat gepaard met ernstig ongerief voor een deel van de dieren, omdat zij een gegeneraliseerde peritonitis ontwikkelen. Er bestaat helaas geen verfijnder model voor peritonitis. Aangezien deze patches veel in de buikholtte zullen worden toegepast, waardoor er een reële kans op infectie is, is de commissie van mening dat het noodzakelijk is om de veiligheid

van de patch onder deze omstandigheden te onderzoeken. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het bloedstelpende effect van (verschillende eigenschappen van) synthetische hemostatische patches, en over de veiligheid, de effecten op langere termijn, het gebruik bij infectiegevaar en het gebruik bij grote bloedingen. De resultaten zullen onder andere een indicatie geven of deze inzichten aanleiding zijn voor het uittesten van deze nieuwe patches bij patiënten. Het belang van meer inzicht in de werking van hemostatische patches en het beschikbaar komen van een alternatieve, volledig synthetische hemostatische patch, acht de DEC substantieel, gezien de nadelen van de op dit moment beschikbare hemostatische patches. De resultaten uit dit onderzoek kunnen op korte termijn vertaald worden naar klinische toepassingen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 69% van de varkens matig ongerief zal ondervinden, 85% van de ratten matig ongerief zal ondervinden en 3,5 % van de ratten ernstig ongerief zal ondervinden als gevolg van de operaties in combinatie met de benodigde handelingen. De overige dieren worden gebruikt in terminale experimenten, waarbij het ongerief beperkt blijft tot het induceren van anesthesie. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**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
AVD103002015348

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015348. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Arts in opleiding tot chirurg
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN (628)
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 14 januari 2015
Geplande einddatum: 14 januari 2021
Titel project: Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties
Titel niet-technische samenvatting: Het gebruik van GAT-Patch om te zorgen voor snellere bloedstolling bij operaties
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Beschrijving Dierproeven
- ☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ Melding Machtiging
- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

14 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**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
AVD103002015348

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 december 2015

Vervaldatum: 15 januari 2016

Factuurnummer: 15700348

Ordernummer: 040823-461220/2015-0012/



Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015348	€ 741,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015348

14 JAN. 2016

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties" met aanvraagnummer AVD103002015348. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 januari 2016 tot en met 13 januari 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een project maximaal voor 5 jaar kan worden vergund. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2021 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 december 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 januari 2016 tot en met 13 januari 2021, voor het project "Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties" met aanvraagnummer AVD103002015348, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Arts in opleiding tot chirurg. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 december 2015, ontvangen op 15 december 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1 Hemostasemodel rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wu (Wistar)	180	Matig / moderate	pilot: terminaal (17%); interventiegroepen: matig (83%)
2 Hemostasemodel varken	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) / Z- of Z/N-lijn	22	Matig / moderate	
3 Afbraak en langetermijneffecten rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wu (Wistar)	40	Matig / moderate	
4 Veiligheid bij contaminatie rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wu (Wistar)	45	Ernstig / severe	
5 Ernstige bloedingen varken	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) / Z- of Z/N-lijn varkens	10	Terminaal / non-recovery	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten, om door te gaan naar de volgende fase, worden afgestemd met de IvD.

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

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

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

Einde van een dierproef

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk april 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.