

	Inventaris Wob-verzoek W16-18S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016486								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x			x	
4	Niet technische samenvatting oud				x			x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie aanvulling aanvraag				x		x		
9	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x			x	
10	Niet technische samenvatting	x		x					
11	Vraag n.a.v. DEC-advies + reacties DEC				x		x		
12	Adviesnota CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

Arv 105002016486



Centrale Commissie Dierproeven

22 MAART 2016

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	RUG
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
KvK-nummer	01179037
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1,
Postbus	
Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN
IBAN	NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

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

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> 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	
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> 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 <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	☐ Nee > Ga verder met vraag 3	
	☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 	

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 4 - 2016
	Einddatum	1 - 4 - 2017
3.2 Wat is de titel van het project?	Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie rondom bij nieuwe deels degradeerbare chirurgische matjes	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC-RUG
	Postadres	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
	E-mailadres	secredec.umcg@umcg.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats GRONINGEN

Datum 21 - 03 - 2016

Handtekening 



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- | | |
|--|---|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | <u>10500</u> |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | <u>Rijksuniversiteit Groningen</u> |
| 1.3 Vul de titel van het project in. | <u>Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model</u> |

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

The massive formation of fibro-connective tissue around regular non-absorbable meshes is held responsible for patient complaints concerning restriction in mobility of the abdominal wall. Combining the needs for reduction of mesh material whilst retaining the required strength resulted in composite meshes, in which absorbable and non-absorbable materials are combined. [REDACTED]

[REDACTED] gives acute strength during the first weeks after implantation. When the absorbable residue of the mesh is replaced by collagen fibers only a low-weight non-absorbable part ensures permanent strength in combination with low patient morbidity. Reduction of the mesh material by replacing non-absorbable material with [REDACTED] material gives a combination of acute strength, long term stability and a more flexible fibro-connective abdominal plate. Therefore, the future for the use of [REDACTED] materials in abdominal wall reconstructive surgery lies in [REDACTED] mesh grafts.

Apart from the need to limit the formation of fibrosis around meshes, absorbable materials are known for their infection resistance, often associated with their increased induction of vascularization. The specific composite to be evaluated consists [REDACTED]

The combination of improved strength and vascularity provided by composite meshes may lend support to reduced wound complications in complex abdominal wall repairs, yielding a durable quality repair for the patient and potentially with an ability to clear bacteria in infection. If improved bacterial clearance can indeed be demonstrated, the composite surgical mesh would provide the first composite based material with demonstrated clearance also offering high strength in soft tissue repair.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

The primary aim of this study is to compare two composite devices (the experimental composite mesh and a commercially available composite mesh, both containing a [REDACTED] [REDACTED] and two non-composite mono-filament knitted polymer meshes [REDACTED] with regard to:

1. Biomaterial associated infection - clearance kinetics
2. Inflammatory responses in the presence of bacteria
3. Angiogenesis in the presence of bacteria

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven

doelstelling(en).

Societal benefit]: Biomaterial associated infections (BAI) have a relatively low incidence rate (1-2% in primary surgical mesh application) but the number of patients is very high (e.g. 1 million hernia meshes applied in the US). The consequences of BAI are enormous: a patient with an infected implant starts a series of hospital visits and antibiotic use, with the almost certain outcome that the infected implant will have to be replaced at high costs and great discomfort for the patient (revision surgery).

In the treatment of abdominal wall hernias in high infection risk patients (infection incident rates >30% are not unusual e.g. in case of revision surgery or co-morbidities like diabetes and obesity) biological degradable meshes are prescribed which showed to be infection resistant. These are however extremely expensive. For that reason composite meshes, which provide [REDACTED] parts in combination with a non-resorbable polymer mesh, are promising. These meshes are mainly indicated to reduce fibrotic encapsulation, but might also reduce infection as a result of the degradable parts of the material.

Scientific benefit: Apart from the societal and medical impact new [REDACTED] meshes may have, the reason why degradable biomaterials would have inherent antimicrobial properties is unclear. Therefore it is necessary to study the inflammatory reaction in combination with the clearance of infection. This is the reason why this study is aiming to get simultaneous infection and inflammation information during the course of the infection by using sophisticated imaging technologies using activatable matrix metalloproteinases (MMP) and angiogenesis agents in combination with bioluminescent bacteria.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In the project the performance will be studied of an experimental [REDACTED] mesh as compared to a predicate composite mesh and two mono-filament non-composite meshes. The model used is an established murine model [1-3] to study inflammation and infection around a subcutaneously implanted biomaterial (such as a surgical mesh in our case).

The experimental mesh is [REDACTED]

The predicate mesh is a commercially available Ethicon PHYSIOMESH™ - comprised of dense, monofilament [REDACTED]

[REDACTED] to provide bond between the films and the mesh, with an additional dyed (D&C Violet No. 2) [REDACTED] film marker.

The non-composite meshes comprise a dense, [REDACTED], macro-porous construct mesh and a dense, [REDACTED] polypropylene, macro-porous construct.

The performance of all 4 types of meshes with respect to clearance of infection, induced inflammation and vascularization at different time points will be studied during 28 days. This will give detailed information about the relationship between infection clearance and inflammation in case of absorbable and non-absorbable meshes.

[REDACTED]

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

In order to get information about the infection persistence and inflammation around the meshes in mice, and to compare these parameters for a number of different mesh types, both *in vivo* imaging and *ex-vivo* histology will be used. This animal model is identical for all mesh types included in this study and is basically a study in mice with subcutaneously implanted meshes.

First for monitoring *in vivo* infection persistence, mice with implants will be inoculated by bioluminescent bacteria (*Staphylococcus aureus*). The radiance of the bioluminescence coming through the skin and detected by a sensitive camera (IVIS Spectrum) is a measure of the number of viable bacteria around the mesh. This will be measured 7 times during 28 days, a period that is sufficiently long for allowing clearance of infections in mice and the relevant foreign body immune responses.

Second, the immune response during this period of time is measured by the use of two types of fluorescent agents. The first agent is an activatable fluorescence moiety that becomes fluorescent after cleavage by MMP's: typical proteases secreted by infiltrated immune cells like polymorphonuclear cells and macrophages to dissolve connective tissue for increased cell infiltration. The second fluorescent agent is a so called " blood pool" agent, that circulates in the blood until it is entering an inflamed area, characterized by increased vascularity and vascular permeability, where it will accumulate. Both agents are injected at three times, followed by fluorescence imaging.

Third, after 28 days mice will be sacrificed and biopsies will be taken from the tissue around the implant, including the implant. These samples will be separated: one part will be applied for culturing, giving a second indication of infection persistence. The second part will be processed for histology: hematoxylin-eosin staining will reveal the infiltration of inflammatory cells around the remnants of the mesh, whereas immuno-histological staining with anti-MMP antibodies will deliver a validation towards the imaging of MMP-agents.

These procedures will be carried out for five groups of mice comprising a total of 60 animals (Balb/c strains with competent immune system) Therefore mice will be implanted with mesh samples of 8 mm diameter, implanted in a subcutaneous channel on the dorsal side, one sample each animal. The first group of 15 mice will get experimental [REDACTED] meshes, the second group of 15 mice will get predicate meshes, whereas the third group of 10 mice will get no mesh at all (but a subcutaneous channel will be created). The last two groups of mice will get non-composite meshes: one group of 10 mice a [REDACTED] mesh, the other a [REDACTED] mesh. Five mice from the first three groups will not be inoculated with bacteria, whereas all other mice will be inoculated with 5×10^7 bioluminescent *S. aureus* Xen36 by needle injection immediately after implantation and wound closure with tissue glue.

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

The project will exist of two consecutive implantation and imaging periods in order to distribute workload, especially with regard to the frequent imaging sessions. The first implantations will involve the animal groups receiving the composite meshes and sham implantation, the second implantation series involves the two animal groups receiving the non-composite meshes. Although the project is performed in two consecutive stages the data obtained can be compared with each other to the full extent, by complying with the concepts of reproducibility as guaranteed by the solid experimental setup. We do not intend to adapt the second stage based on experiences in the first stage. However, the results obtained in the first stage will be evaluated against the expectations described in 3.1 Achtergrond. If the expectations are not sufficiently met, this will be a NoGo for the second stage.

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

Volgnummer	Type dierproef
------------	----------------

1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model
Volgnummer	Type dierproef					
1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals [1-3]. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points. The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

The primary result parameters of the experiment are:

-Infection persistence. It is obtained from the bioluminescence radiance obtained from the bacteria present at the consecutive days during a total experimental period of 28 days. Bioluminescence signals are related to signals from animals without injected bacteria.

-The other parameter indicating infection persistence is the amount of culturable bacteria after termination at day 28. It is the gold-standard of infection persistence and indicates whether or not the mice were able to eradicate the applied infection entirely after 28 days.

-Matrix metalloproteinase (MMP)-expression used as an inflammation marker. MMP-expression is measured by the fluorescence from activated fluorescence agents (MMP Sense, Perkin Elmer) after cleavage of its lysine-lysine bonds by active MMP-2, -3, -9 and -13. The amount of fluorescence is measured after injection

of the agent at day 7, 14 and 28.

- Increased vascularization and vascular permeability, used as additional inflammation markers. These markers are measured during the experimental time at day 7, 14 and 28, by applying an agent (AngioSense, Perkin Elmer) that accumulates from the blood stream in areas as a result of increased vascular permeability.

- Histology is used to study and visualize the distribution and amount of infiltrated inflammatory cells, also indicated by the amount and quality of fibrotic tissue formation.

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

Groups of five mice are housed in separate, ventilated cages with free access to water. In order to prevent feed-associated auto-fluorescence, the mice receive an alfalfa-free diet *ad libitum*.

Mice will be randomly assigned to five groups of 10 or 15 animals each (groups of 10 mice all receive a bacterial inoculum, additional groups of 5 mice receive no bacterial inoculum for the experimental composite mesh systems in the first stage – see also item E: herhaling en duplicering). During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O₂. The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered once, as an analgesic directly before implantation.

Immediately after implantation (day 0), ten mice will receive an inoculum with 5×10^7 CFU in 20 μ L saline alongside the biomaterial sample. Five mice from each group with degradable meshes (or without meshes) will not receive a bacterial inoculation. The relatively high inoculum of 5×10^7 bacteria appeared an inoculum size leading to both culture positive peri-implant tissue biopsies and biomaterial implants in earlier BAI murine models.

For *in vivo* fluorescence imaging, mice under isoflurane/O₂ anesthesia are injected with 2 nmol of each fluorescent probe in a volume of 150 μ L for MMPsense®680 and 100 μ L for Angiosense750 preferably through tail-injection or retro-orbital vein injection depending on the preference of the available bio-technician at days 2, 6 and 13 post-implantation.

Bacterial clearance and inflammation will be evaluated using an In Vivo Imaging System (IVIS® Spectrum Perkin Elmer) on selected days over a period of up to 28 days at days 3, 7, 10, 14, 21 and 28. For imaging, mice are placed in the IVIS under 1.5% isoflurane/O₂ anesthesia, with their back exposed to the camera. After acquiring a grey-scale photograph, a bioluminescence image is obtained (exposure time 1-5 min) using a 21x21 cm field of view and appropriate optical settings and filters. Images are automatically corrected for background noise. Regions of Interest (ROIs) of 5 cm² are manually created for each mouse and will be kept constant for all imaging sessions. Total photon counts over the ROIs are converted to photon fluxes (p/s) due to bioluminescence using *Living Image* software (Perkin Elmer).

The fluorescence fluxes generated from the MMP Sense and AngioSense probes will be quantified in the IVIS® system 24 h after their administration, i.e. at 7, 14 and 28 days post-implantation and in addition to the bioluminescence measurements. Twenty four hours are needed to allow the agents to be accumulated

in the inflamed zone and activated by the enzymatic action (in case of MMP's). Images are acquired using epi-illumination, with excitation/emission at 675/710 nm for MMPsense® 680, and 720/820 nm for Angiosense® 750. These filter combinations are chosen to avoid leakage of excitation light through the emission filter and optimize the ratio between fluorescence from the probe and auto-fluorescence from murine tissue. The emission spectrum of bacterial bioluminescence is located between 400 and 600 nm, with a maximum around 500 nm and is not interfering with the fluorescence spectra of the probes. Manually created ROIs are positioned to capture all the light from the entire spot created by fluorescence light, scattered by the skin. All ROIs are of equal size (5 cm²) and shape for each mouse and imaging session.

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

Group sizes are decided to include 10 mice with similar mesh implants and treatments for infection and inflammation analysis and mesh comparison. This number of mice per group is analogous to group sizes mentioned in a number of scientific papers describing similar animal models [1-3]. If we consider groups of 10 mice and assume that bioluminescence- or fluorescence values for each single measuring point (at a specific day) are normally distributed within a group, with a standard deviation of 0.1, we would be able to measure significant differences between two groups (Alpha=0.05 and Power=0.8) if the difference is larger or equal to around 1.3 times the size of a standard deviation. For a power of 0.9 we are able to discriminate differences larger or equal to around 1.6 times the standard deviation, respectively. In previous research we found differences in bioluminescence and fluorescence between various materials up to 5 to 10 times the standard deviation at several points in time [1-3]. So we believe that group sizes of 10 mice are realistic and deliver sufficient statistical power.

B. De dieren

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

60 Balb-C mice, both male and female, weighing 20-25 grams, typically relatively young (>8 weeks old).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points, and there with a large reduction of animal numbers.

The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

Replacement is not an option for this experiment as this experiment represents the most complex setting of an implant in an infected environment. This setting cannot be reproduced in *in vitro* methods.

Further refinement is achieved by including the MMP and vascularization detection modes in the animal creating a longitudinal follow-up of wound healing and foreign body response, again without sacrifice in a longitudinal follow-up in single mice.

We have chosen mice for the extensive knowledge about and expertise with this species. The infection model is developing fast with little variability resulting in small experimental groups. The chosen experimental model with imaging techniques of both infection progression and inflammation development yields a lot of information and has been applied frequently. Therefore results can be interpreted by relating them to similar studies.

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

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O₂. The analgesic Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered before implantation.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

This has been checked on the basis of literature and reported developments in the field of mesh systems. The meshes going to be used are innovative mesh systems that received rigorous tests to assess elements of biocompatibility that can be investigated before going into animal trials. The non-composite meshes tested in the second stage are well-known and thoroughly tested mesh systems in infection-free animal models and patients. Therefore we skip the measurements without the presence of bacteria.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O₂ (Zeneca, Zoetermeer, The Netherlands). The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered subcutaneously once, as an analgesic during surgery.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Incision and implantation of biomaterial	Discomfort when recovering from anesthesia: a few hours later low. At the start of the experiment, when mice are under anesthesia, Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered.
Injection of <i>S. aureus</i> inoculum	Discomfort will be experienced because of the course of infection. An infection with <i>S. aureus</i> may lead to a subcutaneous abscess, which probably resorbs after a small number of days. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion (4619k). Nevertheless, mice will be monitored on apathic and bad eating and drinking behavior and weight loss.
Anesthesia and Bio-optical imaging measurements	Anesthesia is given with 1.5 – 2% isoflurane during and shortly prior to imaging in order to avoid mouse movements during the exposure time of the camera. Stress will be experienced by animal handling and recovering from anesthesia, where repeated anesthesia can have a larger impact than incidental anesthesia.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

See above

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

Infections: No particular measures as they would bias the course of infection.

Anesthesia and Bio-optical imaging Measurements: The number of imaging sessions is limited to 7 in 28 days. For fluorescence imaging to 3 (imaging session will not need additional anesthesia episodes).

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

If infections do increase beyond the implant site with systemic effects, as monitored by behaviour, apathy, fur, or substantial weight loss (>20%) the animals will be taken out of the experiment and euthanized during isoflurane anesthesia. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion.

Furthermore, the phenomenon of marsupialization may be encountered with subcutaneously implanted mesh discs where they protrude through the skin and then are rejected by the body. This protrusion is defined as a humane endpoint. The animals will be sacrificed upon detection of such an event, and the tissue with implant will still be examined with histology.

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

<5%

K. Classificatie van ongerief

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

Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Histological evaluation

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

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

X Ja



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie (doorbloeding) rondom bij nieuwe, deels degradeerbare chirurgische matjes
1.2 Looptijd van het project	1 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Infectie, Imaging, Biomateriaal, Matje, Degradbaarheid, Biocompatibiliteit

2 Categorie van het project

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

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Vergeleken met niet-afbreekbare synthetische matjes laten biodegradeerbare chirurgische matjes van biologische oorsprong een verhoogde resistentie tegen bacteriële infectie zien, maar toch zijn de zogenoemde Biomateriaal Geassocieerde Infecties (BAI's) een ernstig probleem. Bovendien zijn biodegradeerbare matjes kostbaar en bieden ze soms ook te weinig mechanische sterkte om in alle gevallen van verhoogd infectierisico toegepast te kunnen worden. Volledig afbreekbare, biologische matjes kunnen mogelijk vervangen worden door matjes die wel voldoen aan de mechanische eisen. Die matjes hebben een gelaagde, deels biodegradeerbare sandwich-structuur. In het midden zit een niet-afbreekbaar, macroporeus matje van [REDACTED] Dat wordt geflankeerd door een afbreekbaar matje aan de ene kant en een afbreekbare film aan de andere kant, beide [REDACTED] Het doel van de voorgenomen dierproeven is om dit matje te vergelijken met een gangbaar commercieel verkrijgbaar matje (Ethicon PHYSIOMESH™) en met twee niet-afbreekbare matjes van respectievelijk [REDACTED]. Het gaat daarbij om: 1. infectie-ontwikkeling en -persistentie rond het matje na enting met bacteriën , 2. ontwikkeling van een ontstekingsreactie (inflammatie), 3. vascularisatie (vorming van nieuwe bloedvaten) rond het matje.
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Wetenschappelijk Om nieuwe antimicrobiële strategieën tegen Biomateriaal Geassocieerde Infecties (BAI's) te ontwikkelen, is een goed begrip vereist van de interactie tussen gastheer (het menselijk lichaam) en bacterie. Materiaalkeuze is essentieel, omdat de interactie van het immuunsysteem met het biomateriaal (de vreemdlichaamreactie) invloed heeft op de effectiviteit van het immuunsysteem als het gaat om het onderdrukken van BAI's. De wetenschappelijk hypothese is dat biodegradeerbare materialen het immuunsysteem minder ontregelen, waardoor bacteriële infecties sneller kunnen worden geklaard. Maatschappelijk BAI's zijn nog steeds de belangrijkste reden voor het falen van een implantaat, terwijl het aantal patiënten dat een implantaat van biomateriaal krijgt elk jaar stijgt. De gevolgen van BAI's gaan gepaard met een langer verblijf in het ziekenhuis en hoge behandelingskosten. Vaak is een revisie-operatie nodig, soms overlijden patiënten als gevolg van de BAI. Met name bij mesh systemen (matjes) is het bestrijden van BAI's belangrijk omdat grote aantallen patiënten hiermee behandeld worden.
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	60 Balb/c OlaHsd immuun-competente muizen.
3.4 Wat zijn bij dit project de	Dieren ondervinden negatieve gevolgen voor hun welzijn door de aangebrachte infectie rond het geïmplanteerde matje en door

	verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	de anesthesie die nodig is bij beeldvormende technieken. Niet-geïnfecteerde dieren ondervinden doorgaans weinig hinder van de geïmplanteerde matjes.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Er is over het algemeen sprake van een matig ongerief als gevolg van de infectie en de korte anesthesie.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Na de laatste anesthesie en beeldvormingssessie komen de dieren niet meer bij en worden ze geëuthanaseerd. Weefsel rond het implantaat en het implantaat zelf worden uitgenomen voor histologisch onderzoek.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Het samenspel tussen de antimicrobiële werking van coatings en de immuunrespons van de gastheer ten opzichte van BAI's is niet <i>in vitro</i> na te bootsen. Vandaar dat het gebruik van diermodellen onmisbaar is.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Door het gebruik van bio-optische beeldvormingstechnieken, kunnen infectie en ontsteking gedurende de volledige experimentele tijd in één en dezelfde muis worden gevolgd. Dat betekent dat met een betrekkelijk gering aantal muizen een groot aantal metingen gedaan kan worden.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen	Er wordt gekozen voor muizen vanwege de uitgebreide kennis over en expertise met dit dier. Het type infectiemodel waarvoor is gekozen, is relatief snel en heeft een beperkte variabiliteit (de persistentie van de doorgemaakte infectie varieert niet veel tussen de muizen onderling) wat betekent dat de groepsgrootte beperkt kan zijn.

diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Het gekozen diermodel, waarbij met beeldvormingstechnieken de doorgemaakte infectie en ontsteking in muizen kan worden gevolgd, levert veel informatie op en is vaak toegepast, waardoor de resultaten ook eenvoudig kunnen worden geïnterpreteerd en gerelateerd aan vergelijkbare onderzoeken.

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

Om stress tegen te gaan, worden de muizen in groepen gehuisvest en krijgen ze nestmateriaal (kooiverrijking). Ze worden met grote regelmaat geobserveerd, zodat pijn en ongerief in een vroeg stadium worden opgemerkt. Mocht er pijn optreden, dan krijgen ze pijnbestrijding. Persisteren de problemen dan worden de muizen geëuthanaseerd.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Intern RuG code **8049**)
2. Titel van het project: **Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie (doorbloeding) rondom bij nieuwe, deels degradeerbare chirurgische matjes**
4. Type aanvraag:
 - ☐ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC op: **10-02-2016**
 - ☐ aanvraag compleet: **10-02-2016**
 - ☐ in vergadering besproken op: **18-02-2016**
 - ☐ anderszins behandeld: **14-03-2016**
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot **23-02-2016 tot 08-03-2016**
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - ☐ aanpassing aanvraag: **08-03-2016**
 - ☐ advies aan CCD: **17-03-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:

- Aanwezig:
- 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: **23-02-2016**
- Strekking van de vraag / vragen:
- **Vragen/opmerkingen t.a.v. project aanvraag**
- Aangegeven wordt dat het onderzoek zowel fundamenteel als translationeel onderzoek is. Dit lijkt toch vooral translationeel onderzoek. Bent u het hiermee eens? Zo niet, waarom zou het tevens fundamenteel onderzoek zijn?
- Referenties naar relevante literatuur en eigen voorwerk ontbreken volledig. Er wordt aangegeven dat het een 'established' diermodel betreft maar dit wordt nergens door gestaafd terwijl de onderzoekers er al eerder over gepubliceerd hebben (Daghighi et al., 2012, 2015). Kunt u relevante referenties aanbrengen?
- Bij onderdeel 3.4.3. Om logistieke redenen wordt het project opgedeeld in meerdere (2) groepen dieren die na elkaar door het protocol gaan. Echter, de onderzoeker wil de verschillende typen matjes naar type verdelen over de groepen. Er wordt geen duidelijke motivatie voor deze scheiding aangevoerd, bv : go-no go voor 2e groep o.b.v. resultaat 1e groep. Als die rationale er niet is zou het qua experimentele design beter zijn om de types 'netjes' te verdelen over de groepen.
- **T.a.v. de statistiek: Er zijn hier wat onduidelijkheden die hieronder verder worden uitgesplitst.**
- Hoe wordt de statistiek gedaan? De zin 'If we consider each measuring point as an average over 10 mice' is wat verwarrend. Wat wordt hiermee bedoeld? Wordt hier een serie van T-tests uitgevoerd per tijdstip/meting, of wordt hier daadwerkelijk een gemiddelde berekend dat de input van het statistisch model is. De laatste zin doet vermoeden dat het niet om een berekend gemiddelde gaat, maar een test per tijdstip/meting. Graag bevestiging van de methode en als het kan de tekst iets duidelijker maken.
- Als er inderdaad een serie van T-testen wordt uitgevoerd dan kan de laatste zin van de paragraaf 'It is reasonable to expect that if there are significant differences between either of the groups this will be detected in one or more of the 15 observation points.' voor problemen kan zorgen bij de beoordeling van de CCD. Als er afzonderlijke toetsen worden gedaan op herhaalde metingen dan zal hiervoor een correctie van de alpha moeten worden gedaan (multiple comparisons correctie). Met herhaalde metingen wordt b.v. bedoeld dat met de 7 bioluminescentie 'measuring points' per dier in principe steeds hetzelfde gemeten wordt. Met meervoudig testen neemt de onderzoeker kans op een type 1 fout (onterecht

verwerpen van de gekozen nul hypothese). Als het herhaalde metingen gedaan worden dan valt te overwegen om een repeated measures model hiervoor in de plaats te stellen (per outcome parameter: bioluminescentie etc). Een van de uitkomstmaten wordt dan het primaire eindpunt (waarop de sample size berekening gedaan wordt), de andere secundair. Herhaalde metingen binnen een model geven veel meer statistische power dan de afzonderlijke (gecorrigeerde) testen doordat een betere schatting gemaakt wordt van het gemiddelde binnen het dier, waardoor de spreiding tussen dieren afneemt.

- De DEC vraagt zich af of het rekenvoorbeeld correct is. Er wordt gesteld dat gegeven de sample size een verschil kan worden gemeten in de orde van grootte van $1.3 \times$ de standaard deviatie. Het verdere rekenvoorbeeld gaat echter uit van verschillen van $1.3 \times$ het gemiddelde. Is het niet zo dat de bovengrens van het te detecteren verschil 1.13 zou zijn ($10^5 + 1.3 \times 10^4$)? Met dat verschil komt de DEC inderdaad in de orde van grootte van 9 tot 10 dieren.
- De rationale voor het niet meenemen van de niet met bacteriën geïnfecteerde controlegroepen voor de niet afbreekbare matjes ontbreekt.
- T.a.v. onderdeel D 'Vervanging, vermindering en verfijning': als verfijning wordt aangevoerd dat er 2 metingen (MMP-activiteit & vascularisatie) zijn toegevoegd, die ook als primaire doel/uitleesparameter zijn opgevoerd. Dit lijkt wat mager. In de NTS wordt veel meer verfijning opgevoerd, dit zou ook genoemd kunnen worden in het projectvoorstel.
- Het protocol beschrijft verschillende types analgesie voor dezelfde procedure (hoofdproject: buprenorfine, bijlage1 Rymadyl/carprofen). Mogelijk is buprenorfine geschikter hier omdat de read-outs infectie/inflammatie zijn en carprofen (is NSAID) anti-inflammatoire effecten heeft.
- Datum antwoord: **08-03-2016**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja**.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. **Ja**.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren. **Ja**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **NVT**.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en). **Ja**.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als **substantieel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. **NVT**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, de inschatting is realistisch en goed geclassificeerd.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen. De onderzoekers willen de interactie tussen het volledige en intacte immuunsysteem en implanteerbare biomaterialen onderzoeken. Dit kan niet anders dan in levende dieren.**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren

lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja. Aan het vereiste van vermindering wordt door de onderzoekers tegemoetgekomen door: 1) gebruik van longitudinale in vivo imaging technieken om meerdere tijdstippen in hetzelfde dier te meten, 2) voor twee experimentele groepen hoeft een controle groep niet gemeten te worden omdat deze gegevens al in de literatuur beschikbaar zijn (voorkomen van onnodige duplicatie) en 3) De onderzoekers hebben een go/no go moment ingebouwd om onnodig gebruik van dieren in de 2^e fase van de studie te voorkomen. Het maximale aantal te gebruiken dieren is gebaseerd op eigen eerder onderzoek en realistisch ingeschat.**

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de behandeling van de dieren zo humaan mogelijk wordt uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja. De onderzoekers kiezen voor een diermodel dat eerder gebruikt is en wat verregaand geoptimaliseerd is. Daarnaast is er oog voor optimale huisvesting en worden de dieren aansluitend aan de laatste scan getermineerd zonder bij te komen uit de anaesthesie. Dit alles draagt bij aan de verfijning van de proef.**
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. **Ja.**

D. Ethische afweging

Implanteerbare chirurgische matjes van biomaterialen worden wereldwijd op grote schaal gebruikt in mensen, bijvoorbeeld bij de behandeling van abdominale hernia's. Een substantieel deel van de implantaties gaat gepaard met infectie, inflammatie en afstotingsreacties, die ernstige complicaties en vermindering van de kwaliteit van leven bij patiënten veroorzaken. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de (combinatie van) gebruikte biomaterialen van invloed is op het optreden van infectie en inflammatie.

In het hier voorgestelde translationele onderzoek willen onderzoekers matjes van een aantal materialen (gedeeltelijk afbreekbare), waaronder

een recent ontwikkeld nieuw type, vergelijken m.b.t. het optreden van inflammatie en infectie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een bestaand diermodel gecombineerd met bestaande en nieuwe imaging technieken. De onderzoekers hebben een helder plan geformuleerd en besteden duidelijk aandacht aan de 3 V's.

Gezien de expertise en ervaring van de onderzoeksgroep met het gekozen diermodel, de gebruikte technieken en de gekozen termijn van 1 jaar is de kans op een succesvolle studie naar het oordeel van de DEC groot. De potentiële wetenschappelijke en maatschappelijke opbrengsten zijn goed omschreven en wegen naar het oordeel van de DEC op tegen het matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op **consensus**.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

RUG

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD105002016486

Bijlagen

2

Datum 21 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016486. 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: 10500

Naam instelling of organisatie: RUG

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 01179037

Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1,

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

IBAN: NL80ABNA0446049352

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 april 2016
Geplande einddatum: 1 april 2017
Titel project: Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie rondom bij nieuwe deels degradeerbare chirurgische matjes
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Groningen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

RUG

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD105002016486

Bijlagen

2

Datum 21 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 maart 2016

Vervaldatum: 20 april 2016

Factuurnummer: 16700486

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016486	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,
9713 AV Groningen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002016486

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 11 april 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" met aanvraagnummer AVD105002016486. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat onvoldoende informatie met betrekking tot de doelstelling. Daarnaast is de NTS te moeilijk beschreven, en moeilijk te begrijpen voor het brede publiek. Graag ontvangen wij een Niet technische samenvatting die voldoet aan de eisen. Deze eisen kunt u vinden op onze website www.centralecommissiedierproeven.nl.

Onduidelijkheden

In uw projectaanvraag beschrijft u helder dat de dierproeven in 2 fasen zullen worden uitgevoerd. Dit komt niet duidelijk naar voren in de bijlage dierproeven. Daar lijkt het of alle 60 muizen tegelijk worden ingezet en is geen helder onderscheid tussen de 2 fasen. Wij verzoeken u deze informatie te verhelderen.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum

11 april 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002016486

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Naam aanvrager | | | |
| Postcode | | Huisnummer | |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | | | |
|----------------|--|--|--|
| Aanvraagnummer | | | |
|----------------|--|--|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- | | | | |
|--------------|---|---|----|
| Naam | | | |
| Datum | - | - | 20 |
| Handtekening | | | |

Onderwerp: antwoorden op vragen mbt aanvraag AVD105002016486

Hartelijk dank voor het commentaar op de aanvraag AVD105002016486

We hebben de NTS herschreven en daarbij meer informatie aangeleverd leidend tot de doelstelling. Ook is het taalgebruik verder vereenvoudigd. Daarbij hebben we gekeken hoe dit onderwerp op fora en websites met betrekking tot het gebruik van begrippen behandeld wordt.

Tevens is in de beschrijving dierproeven de fasering opgenomen zoals gevraagd, deze is in het rood weergegeven.

De NTS en de beschrijving dierproeven zijn bijgevoegd.

Met vriendelijke groet,





Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	RUG				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>1</td><td>Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model
Volgnummer	Type dierproef					
1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals [1-3]. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points. The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

The primary result parameters of the experiment are:

-Infection persistence. It is obtained from the bioluminescence radiance obtained from the bacteria present at the consecutive days during a total experimental period of 28 days. Bioluminescence signals are related to signals from animals without injected bacteria.

-The other parameter indicating infection persistence is the amount of culturable bacteria after termination at day 28. It is the gold-standard of infection persistence and indicates whether or not the mice were able to eradicate the applied infection entirely after 28 days.

-Matrix metalloproteinase (MMP)-expression used as an inflammation marker. MMP-expression is measured by the fluorescence from activated fluorescence agents (MMP Sense, Perkin Elmer) after cleavage of its lysine-lysine bonds by active MMP-2, -3, -9 and -13. The amount of fluorescence is measured after injection

of the agent at day 7, 14 and 28.

- Increased vascularization and vascular permeability, used as additional inflammation markers. These markers are measured during the experimental time at day 7, 14 and 28, by applying an agent (AngioSense, Perkin Elmer) that accumulates from the blood stream in areas as a result of increased vascular permeability.

- Histology is used to study and visualize the distribution and amount of infiltrated inflammatory cells, also indicated by the amount and quality of fibrotic tissue formation.

The project consists of two consecutive implantation and imaging periods in order to distribute workload, especially with regard to the frequent imaging sessions.

The first implantation series will involve the animal groups receiving the composite meshes and sham implantation (three animal groups with 40 animals).

The second implantation series involves the two animal groups (20 animals) receiving the non-composite PTFE and PP meshes.

The results obtained in the first stage will be evaluated against the expectations. If the expectations are not sufficiently met, this will be a NoGo for the second implantation series. The expectation is that the composite mesh will outperform the control device in the infected environment because of better tissue integration and faster blood vessel formation as a result of the special designed bioabsorbable materials. The second phase will compare the permanent components of the same devices, which is intended to understand the device performance after bioabsorbable materials are fully degraded.

[REDACTED]

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

Groups of five mice are housed in separate, ventilated cages with free access to water. In order to prevent feed-associated auto-fluorescence, the mice receive an alfalfa-free diet *ad libitum*.

Mice will be randomly assigned to five groups of 10 or 15 animals each.

In the first stage two groups of 15 mice will receive composite meshes, of these 15 mice in each of the two groups, 10 mice will receive a bacterial inoculum, and 5 mice will not be inoculated. The third group consists of 10 mice that all will receive the sham operation, which consists of the full surgical procedure without the implantation of mesh systems. Five of the mice additionally receive the bacterial inoculum, whereas the other 5 do not receive the bacterial inoculum. In stage I a total of 40 mice will be used.

In the second stage two more groups will be implanted with the non-composite meshes PTFE and PP. Each group contains 10 mice that all will additionally be inoculated with bacteria. In stage II a total of 20 mice will be used. The use of non-infected animals in this second stage is not necessary because of ample knowledge about the behavior of these mesh systems in non-infected animal models. Furthermore, the data obtained can directly be compared with the data obtained with the composite mesh systems in our study (stage I).

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O₂. The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered once, as an analgesic directly before implantation.

Immediately after implantation (day 0), ten mice will receive an inoculum with 5×10^7 CFU in 20 μ L saline alongside the biomaterial sample. Five mice from each group with degradable meshes (or without meshes) will not receive a bacterial inoculation. The relatively high inoculum of 5×10^7 bacteria appeared an inoculum size leading to both culture positive peri-implant tissue biopsies and biomaterial implants in earlier BAI murine models.

For *in vivo* fluorescence imaging, mice under isoflurane/O₂ anesthesia are injected with 2 nmol of each fluorescent probe in a volume of 150 μ L for MMPsense®680 and 100 μ L for Angiosense750 preferably through tail-injection or retro-orbital vein injection depending on the preference of the available bio-technician at days 2, 6 and 13 post-implantation.

Bacterial clearance and inflammation will be evaluated using an In Vivo Imaging System (IVIS® Spectrum Perkin Elmer) on selected days over a period of up to 28 days at days 3, 7, 10, 14, 21 and 28. For imaging, mice are placed in the IVIS under 1.5% isoflurane/O₂ anesthesia, with their back exposed to the camera. After acquiring a grey-scale photograph, a bioluminescence image is obtained (exposure time 1-5 min) using a 21x21 cm field of view and appropriate optical settings and filters. Images are automatically corrected for background noise. Regions of Interest (ROIs) of 5 cm² are manually created for each mouse and will be kept constant for all imaging sessions. Total photon counts over the ROIs are converted to photon fluxes (p/s) due to bioluminescence using *Living Image* software (Perkin Elmer).

The fluorescence fluxes generated from the MMP Sense and AngioSense probes will be quantified in the IVIS® system 24 h after their administration, i.e. at 7, 14 and 28 days post-implantation and in addition to the bioluminescence measurements. Twenty four hours are needed to allow the agents to be accumulated in the inflamed zone and activated by the enzymatic action (in case of MMP's). Images are acquired using epi-illumination, with excitation/emission at 675/710 nm for MMPsense®680, and 720/820 nm for Angiosense®750. These filter combinations are chosen to avoid leakage of excitation light through the emission filter and optimize the ratio between fluorescence from the probe and auto-fluorescence from murine tissue. The emission spectrum of bacterial bioluminescence is located between 400 and 600 nm, with a maximum around 500 nm and is not interfering with the fluorescence spectra of the probes. Manually created ROIs are positioned to capture all the light from the entire spot created by fluorescence light, scattered by the skin. All ROIs are of equal size (5 cm²) and shape for each mouse and imaging session.

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

Group sizes are decided to include 10 mice with similar mesh implants and treatments for infection and inflammation analysis and mesh comparison. This number of mice per group is analogous to group sizes mentioned in a number of scientific papers describing similar animal models [1-3]. If we consider groups of 10 mice and take into consideration that bioluminescence- or fluorescence values for each single measuring point (at a specific day) are normally distributed within a group, with a standard deviation of 0.1, we would be able to measure significant differences between two groups (Alpha=0.05 and Power=0.9) if the difference is larger or equal to around 1.3 times the size of a standard deviation. For a power of 0.9 we are able to discriminate differences larger or equal to around 1.6 times the standard deviation, respectively. In previous research we found differences in bioluminescence and fluorescence between various materials between 2 to 10 times the standard deviation at several points in time [1-3]. So we believe that group sizes of 10 mice are realistic and deliver sufficient statistical power. **Non-infected groups are smaller (5 mice) because the variation in these mice, not suffering from an infection, are far smaller.**

[REDACTED]



B. De dieren

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

60 Balb-C mice, both male and female, weighing 20-25 grams, typically relatively young (>8 weeks old).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points, and there with a large reduction of animal numbers.

The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

Replacement is not an option for this experiment as this experiment represents the most complex setting of an implant in an infected environment. This setting cannot be reproduced in *in vitro* methods.

Further refinement is achieved by including the MMP and vascularization detection modes in the animal creating a longitudinal follow-up of wound healing and foreign body response, again without sacrifice in a longitudinal follow-up in single mice.

We have chosen mice for the extensive knowledge about and expertise with this species. The infection model is developing fast with little variability resulting in small experimental groups. The chosen experimental model with imaging techniques of both infection progression and inflammation development yields a lot of information and has been applied frequently. Therefore results can be interpreted by relating them to similar studies.

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

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O₂. The analgesic Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered before implantation.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

This has been checked on the basis of literature and reported developments in the field of mesh systems. The meshes going to be used are innovative mesh systems that received rigorous tests to assess elements of biocompatibility that can be investigated before going into animal trials. The non-composite meshes tested in the second stage are well-known and thoroughly tested mesh systems in infection-free animal models and patients. Therefore we skip the measurements without the presence of bacteria.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O₂ (Zeneca, Zoetermeer, The Netherlands). The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and

positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered subcutaneously once, as an analgesic during surgery.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Incision and implantation of biomaterial	Discomfort when recovering from anesthesia: a few hours later low. At the start of the experiment, when mice are under anesthesia, Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered.
Injection of <i>S. aureus</i> inoculum	Discomfort will be experienced because of the course of infection. An infection with <i>S. aureus</i> may lead to a subcutaneous abscess, which probably resorbs after a small number of days. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion. Nevertheless, mice will be monitored on apathic and bad eating and drinking behavior and weight loss.
Anesthesia and Bio-optical imaging measurements	Anesthesia is given with 1.5 – 2% isoflurane during and shortly prior to imaging in order to avoid mouse movements during the exposure time of the camera. Stress will be experienced by animal handling and recovering from anesthesia, where repeated anesthesia can have a larger impact than incidental anesthesia.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

See above

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

Infections: No particular measures as they would bias the course of infection.

Anesthesia and Bio-optical imaging Measurements: The number of imaging sessions is limited to 7 in 28 days. For fluorescence imaging to 3 (imaging session will not need additional anesthesia episodes).

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

If infections do increase beyond the implant site with systemic effects, as monitored by behaviour, apathy, fur, or substantial weight loss (>20%) the animals will be taken out of the experiment and euthanized during isoflurane anesthesia. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion.

Furthermore, the phenomenon of marsupialization may be encountered with subcutaneously implanted mesh discs where they protrude through the skin and then are rejected by the body. This protrusion is defined as a humane endpoint. The animals will be sacrificed upon detection of such an event, and the tissue with implant will still be examined with histology.

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

<5%

K. Classificatie van ongerief

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

Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Histological evaluation

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

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

X Ja

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 5 april 2016 15:27
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD105002016486

Categorieën: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

De DEC heeft de aanvraag anders gelezen dan de CCD met betrekking tot eerder verkregen resultaten. De onderzoeker stelt dat in eerder onderzoek verschillen tot maximaal 5-10 maal de standaard deviatie zijn gevonden. De DEC heeft dit gelezen als de bovengrens van de 'effect size' die in onderzoek met een vergelijkbare opzet is gevonden. Het maximaal te verwachten effect op basis van eerder onderzoek ligt dus in de orde van 5-10 x de standaarddeviatie. Echter, dit zegt niets over hoe klein de 'effect size' kan zijn, of bijvoorbeeld mag zijn, om voor de onderzoeker relevant te zijn in deze studie. En het is met name deze ondergrens die kritiek is voor het bepalen van de sample size. Elk nieuw onderzoek zal veranderingen met zich meebrengen die er voor kunnen zorgen dat de grootte van de verschillen substantieel kleiner zijn dan die gevonden in eerdere studies (gebruik van andere materialen, etc). De door de onderzoeker gebruikte sample size berekening was voor de DEC de ondergrens (1.3 x de standaard deviatie) en uitdrukking van dit effect. Met andere woorden, de verwachtte verschillen liggen tussen de 1.3 en 10 maal de standaarddeviatie. Daarom acht de DEC het niet realistisch is om een grens van 5x de standaard deviatie als ondergrens te gebruiken. Hiermee loop je, naar oordeel van de DEC, een substantieel risico om een studie te krijgen met te weinig power, hetgeen niet overeen komt met het streven naar reductie.

Met vriendelijke groet, namens de DEC-RUG

[REDACTED]

[REDACTED]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: donderdag 31 maart 2016 15:49
To: [REDACTED]
Subject: Aanvullende informatie aanvraag AVD105002016486

Beste DEC RUG,
 Enige tijd geleden heeft u ons een advies gestuurd betreffende aanvraag AVD105002016486 getiteld: "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model"
 Onze dank voor dit advies. Wij hebben nog 1 vraag over deze aanvraag.

In uw DEC advies beschrijft u dat u de aanvrager om verduidelijking heeft gevraagd betreffende de powerberekening. In de aanvraag zoals die nu bij ons voorligt schrijft de aanvrager:
 Group sizes are decided to include 10 mice with similar mesh implants and treatments for infection and inflammation analysis and mesh comparison. This number of mice per group is analogous to group sizes mentioned in a number of scientific papers describing similar animal models [1-3]. If we consider groups of 10 mice and assume that bioluminescence- or fluorescence values for each single measuring point (at a specific day) are normally distributed within a group, with a standard deviation of 0.1, we would be able to measure significant differences between two groups (Alpha=0.05 and Power=0.8) if the difference is larger or equal to around 1.3 times the size of a standard deviation. For a power of 0.9 we are able to discriminate differences larger or equal to around 1.6 times the standard deviation, respectively.

Wij begrijpen dat bij een n van 10 muizen per groep een verschil tussen groepen van 1.3 x de standaarddeviatie kan worden opgepikt. Daarna schrijft de onderzoeker echter: "In previous research we found differences in bioluminescence and fluorescence between various materials up to 5 to 10 times the standard deviation at several points in time [1-3]. So we believe that group sizes of 10 mice are realistic and deliver sufficient statistical power."

Dit impliceert dat het aantal van 10 muizen per groep in ieder geval voldoende is. De vraag die nu bij ons rijst is of dit aantal van 10 dieren per groep niet te groot is. Als een verschil van minimaal 5x de standaarddeviatie wordt

verwacht (waarom zou dit anders zijn dan in voorgaande studies), zou dan toch met veel minder dieren per groep kunnen worden volstaan?

Wat is de mening van DEC RuG hierover? Kunt u dit toelichten?

Graag ontvangen wij een reactie op deze vraag uiterlijk 5 april 2016 voor 16.00 uur, zodat wij indien nodig de aanvrager dezelfde vraag nog kunnen voorleggen.

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

RUG

A. Deusinglaan 1,
9713 AV GRONINGEN



**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
AVD105002016486
Bijlagen
1

Datum 2 mei 2016
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" met aanvraagnummer AVD105002016486. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de NTS aangepast op inhoud en begrijpelijker taalgebruik. Daarnaast heeft u op ons verzoek fasering in bijlage 1 beschreven.

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 het afstemmen van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in dierproeven te voorkomen.

U kunt met uw project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 mei 2016 tot en met 1 april 2017.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. Bij de

beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 5 april 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Deze aanvulling betrof een nadere uitleg over de mening van de DEC over de statistische onderbouwing van de groepsgrootte in de experimenten. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie, inclusief de aanvulling op het advies. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er wordt wel een algemene voorwaarde gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

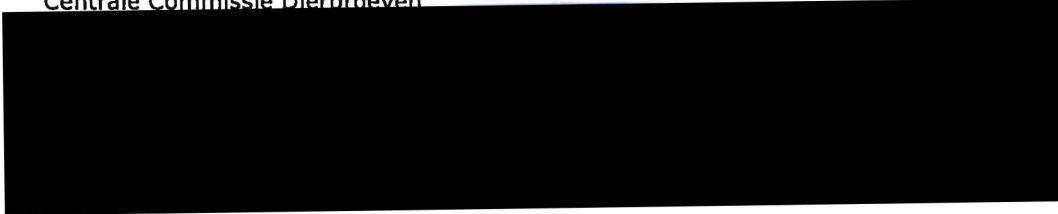
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven



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: RUG

Adres: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 mei 2016 tot en met 1 april 2017, voor het project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" met aanvraagnummer AVD105002016486, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 april 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016; aanvullend advies ontvangen op 5 april 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 april 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model	Muizen (Mus musculus)	60	100% Matig	

Voorwaarden

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

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

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.