

	Inventaris Wob-verzoek W17-11								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20171825	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x	
5	DEC-advies				x	x	x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Vraag en antwoord aanvulling				x		x		
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x		

1825

26 MEI 2017



1.

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen										
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9				
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen											
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn											
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9											
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	[Redacted]	Postbus	[Redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
Straat en huisnummer	[Redacted]											
Postbus	[Redacted]											
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen											
IBAN	NL90ABNA0231209983											
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud											
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>PhD student</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Functie	PhD student	Afdeling	[Redacted]	Telefoonnummer	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]											
Functie	PhD student											
Afdeling	[Redacted]											
Telefoonnummer	[Redacted]											
E-mailadres	[Redacted]											
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Associate Professor</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Functie	Associate Professor	Afdeling	[Redacted]	Telefoonnummer	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]											
Functie	Associate Professor											
Afdeling	[Redacted]											
Telefoonnummer	[Redacted]											
E-mailadres	[Redacted]											

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

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

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

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

☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

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

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

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

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

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

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

3 Over uw project

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

Startdatum	0 1 _ 0 6 _ 2 0 1 7
Einddatum	0 1 _ 0 6 _ 2 0 2 1

- 3.2 Wat is de titel van het project?

PIC hydrogels for wound dressing purposes

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

Het karakteriseren van nieuwe vloeibare pleisters

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

Naam DEC	RU DEC
Postadres	[Redacted]
E-mailadres	[Redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035,00

Lege

☐ Wijziging €

Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☒ DEC-advies en factuurinformatie

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

[Redacted]

Functie

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats

Nijmegen

Datum

23 - 05 - 2017

Handtekening

[Redacted]

Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	XXXXXXXXXX for wound dressing purposes

2 Categories

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

☐	Higher education or training
☐	Forensic enquiries
☐	Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Burns are complex types of wounds (see fig. 1). First degree burns only affect the epidermis and often do not need special care to heal normally (e.g. sunburns). Second degree burns extend into the dermis, while third degree burns affect deeper tissues. These often large wounds are very prone to infections. Moreover, severe skin wounds following burns, trauma, or surgery often lead to scar formation and impaired functionality, aesthetical, and psychosocial problems. Cutaneous wound repair is a dynamic and highly regulated process, involving several overlapping phases: inflammation, proliferation, and remodeling [1]. Aberrant wound repair and scarring occurs after prolongation of the inflammatory phase that together with oxidative stress fuels (myo)fibroblast proliferation and interferes with myofibroblast apoptosis. This leads to disproportionate deposition of extracellular matrix proteins, subsequently promoting excessive scar formation. Unfortunately, conventional therapies to accelerate wound repair and to prevent scarring are insufficient.



Figure 1: Examples of burn wound patients suffering from excessive scarring. On the left, a significant part of the patient's back is affected. Scarring on the shoulder limits rotation of the arm. In the middle, scarring on the forearm has made the patients skin more tight, limiting the use of his hand. On the right, severe scarring on the elbow and forearm have reduced the patients ability to stretch the arm completely.

Burns account for a significant part of morbidity, and thus contribute to a large portion of hospitalization times, disfigurements, and disabilities. It was reported that over 7.1 million burn related injuries occur worldwide every year, resulting in 18 million Disability Adjusted Life Years (DALY's) [2]. These injuries occur predominantly in low income countries, due to the use of primitive stoves for cooking and heating [2, 3]. Burns are one of the most common household injuries and have a remarkably high incidence rate among infants. It has been reported that modern treatment of burns in the western world may cost up to \$1000 per day [4]. The total spending on healthcare of burn wounds is thus very high, and the desire for new and cheaper treatments that preferably reduce hospitalization times is desired. Current wound dressing techniques are far from optimal [5-9]. Burn wounds often suffer from complications such as prolonged inflammation and excessive collagen deposition that nearly always result in excessive scar formation [10, 11]. However, another important factor plays a major role in the treatment of burn wounds. Namely, the comfort of the patient. Dressing changes tend to be frequent (often daily) and almost always extremely painful, which leads to great patient discomfort [12]. Patients are thus often very afraid to renew their bandages. Moreover the currently used plasters and dressings have a high risk of damaging the underlying regenerating wound area as well as increase the size of the wound when it is removed [12]. This repeated injury to the healing wound causes novel inflammatory reactions that can refuel the myofibroblast activity promoting chronic inflammation and scar formation.

Thus, new and improved wound dressings are desired that are easy to use, not discomforting for the patient, and may actively help the wound healing process. Recently, a novel hydrogel, polyisocyanopeptide (PIC) gel, has been developed by the group of professor [redacted] Nijmegen [13]. This synthetic material consists of a poly-isocyanopeptide (PIC) polymer dissolved in water (or a similar medium). It exhibits mechanical properties that perfectly match those of collagen and fibrin filaments, more specifically it is the only synthetic gel in the world that displays the strain stiffening properties of the natural extracellular matrix (ECM) that control cell motility and differentiation [14]. Since these gels

mimic the extracellular micro-environment of humans it can be expected that they can promote tissue integrity and homeostasis. In addition, the polymer solution has a thermo-sensitive gelation property, meaning that the 3D gel scaffold is only formed upon warming. The liquid polymer dressing can [REDACTED]. This enables [REDACTED]. The [REDACTED] is then [REDACTED]. This allows [REDACTED]. We suspect [REDACTED] removes the gel without disturbing the wound repair process, in contrast to current wound plasters and dressings. [REDACTED] can also be [REDACTED]. Lastly, PIC hydrogels may be able to [REDACTED]. We speculate possible future applications of [REDACTED] to prevent or treat infections. In addition, [REDACTED].

If we compare PIC gel dressings to products currently used by the dutch burn wound institute we can identify several improvements. Hydrocolloid dressings (e.g. Duoderm), transparant film dressings (e.g. Tegaderm), and hydrofibers (e.g. Aquacel) are typically difficult to apply to irregular areas (e.g. fingers). They must be cut to fit the shape of the wound, and often have an adhesive edge that should not be applied to the wound but instead to the undamaged surrounding skin. Furthermore, recent studies have shown that silicone-, poly-urethane-, and hydrocolloid-based wound dressings still damage the stratum corneum upon removal [15, 16], which suggests that all sheet- or bandage-based dressings may damage the wound bed to some degree. PIC gel is strictly easier to apply, as you can [REDACTED]. We speculate the risk of re-injury of the wound upon removal of PIC is very low, as [REDACTED]. In addition, therapeutic PIC gels may be developed later that can replace some of the currently used products. For example, [REDACTED], such [REDACTED], may be replaced with [REDACTED] as these can serve as both the primary wound dressing and [REDACTED]. Lastly, it is important to point out some of the differences between currently used amorphous hydrogel wound dressing products and PIC gels. Many different source materials for the formation of these hydrogels exist. Examples include Chitosan (a polysaccharide harvested from crustaceans), Glycerol gels (harvested from plants/animals or produced synthetically), and Carboxymethyl cellulose & propylene glycol gels (synthetic). All these gels have one or several characteristics that are beneficial to a certain application. For example, chitosan gels are popular because their biological origin make them very biocompatible and they have inherent antibacterial properties [17]. While certain other gels may not be inherently antibacterial but offer other benefits, such as *in situ* formation [18, 19]. A typical problem of biological gels is that the product may suffer from batch-to-batch inconsistencies, as they are harvested from animals or plants. While synthetic gels are often complex to produce, and can sometimes leave toxic break down products. We believe PIC gels may combine and even improve many of these characteristics into one easily produced synthetic product. For example, PIC gels [REDACTED]. Moreover, the [REDACTED] PIC gels could result in [REDACTED]. Even removal of the gel from the wound may be improved by [REDACTED] and thus reduce patient discomfort. PIC gel also distinguishes itself from competing products in other practical aspects. For example, in 2015 Zeng et al. presented a thermosensitive Bioglass/Agarose-Alginate hydrogel wound dressing intended for chronic wounds [20]. However, their product is formed by mixing and maintaining the components above 50°C, then applying it to the wound and letting it gelate upon cooling down to physiological temperatures. PIC gels distinctly

differ themselves from products such as these, because

. This is practical as the dressings can . The clinician may then

So to summarize the potential characteristics of PIC gel that may be beneficial either clinically or commercially:

- The application process of PIC gel dressings becomes simple by . This should make application in difficult areas, such as fingers or toes, significantly easier.
- Dressing removal by may improve patient comfort by being less painful than current methods. Moreover, this mild replacement technique may prevent repeated damage to the healing wound and may allow the repair process to continue without interference. We postulate that the removal of the gel results in less inflammation and doesn't promote scar formation.
- Due to the , the dressing may and .
- The gel may
- can be achieved simply:
- The material is fully synthetic, and thus does not involve the use of animals or plants in its production. This also means its production is more easily upscaled and that healthcare costs can be reduced by streamlining the production process.
- PIC can be produced beforehand and are easily stored under sterile conditions in fridges or freezers.

To translate this PIC gel into a Phase 1 clinical study on human patients, a consecutive series of preclinical experiments has to be performed. Therefore, the project is divided into workpackages that focus on:

We have already demonstrated that PIC gel production can be standardized and that the gel can pass cytotoxicity testing (Fig 2). PIC gel shows similar non-toxic behavior as Matrigel, a thermosensitive hydrogel that is commonly used for cell culture applications (but may not be applied in humans due to being derived from murine tumors). This warranted the start of animal studies, as required to initiate a Phase 1 clinical trial and for CE approval. Previously, our consortium performed two mice studies at the CDL animal facility in Nijmegen. In the first study (DEC 2013-138), we applied PIC and RGD-peptide functionalized PIC gel wound dressings to full thickness wounds. The histological effects were studied after 3 and 7 days of wound healing. It was found that

In addition, the results lead to experimental optimizations and insights that were helpful in the design of new studies. In the second study (WP 2014-208-009) an experiment was performed involving imaging of radio-actively-labeled PIC gel with a SPECT/CT scanner. The purpose of this study was to track the migration of PIC gel in the wounded mouse over 7 days. The previous study taught us that mice disturb the gel in the wound by licking it clean, and thus we introduced a secondary dressing (consisting of a Tegaderm sheet and a bandage) to shield the wound and gel from the mouse. We concluded that

From these studies it became evident that the PIC gel is

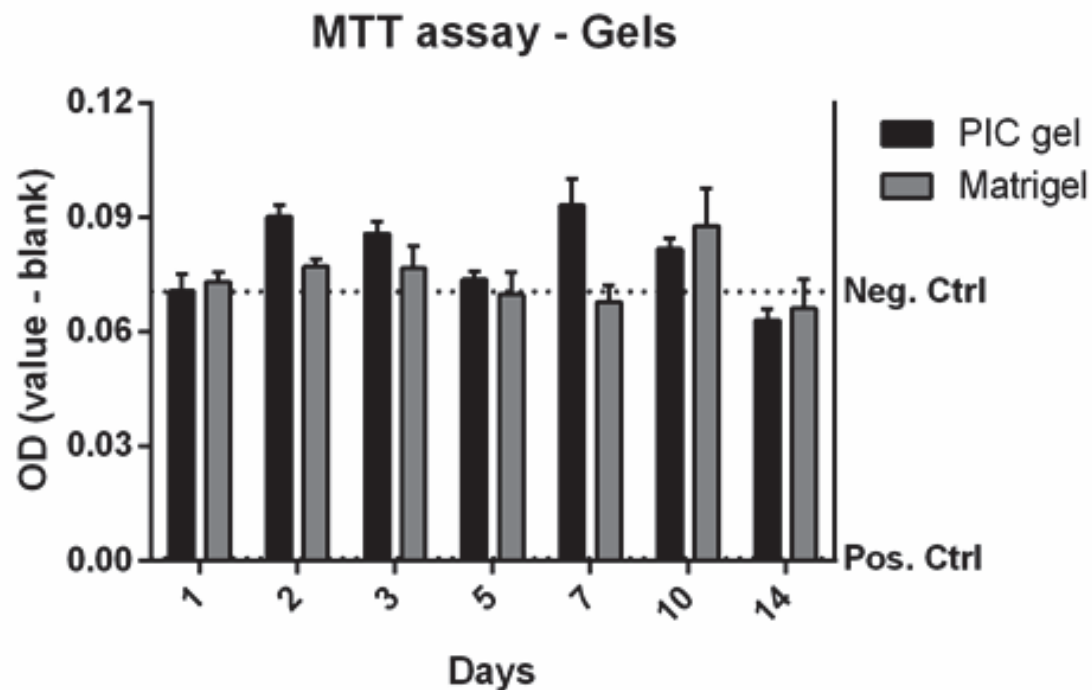


Figure 2: MTT assay for metabolic activity. Human dermal fibroblast activity was not significantly decreased after coming in contact with PIC gels (4 mg/ml) or the commercially available Matrigel (control product). This implies the gel is non-toxic to fibroblasts, the most abundant cell type in wounds.

We hypothesize that the PIC gel wound dressings may fill a gap in current dressing techniques by

Therefore, we are convinced that the possible clinical benefits of the PIC gel weigh up against the use of mice in the experiments proposed in this application.

One key aspect of the PIC gel project is to establish [REDACTED]. Our previous study showed that [REDACTED] should occur before the wound is fully closed to try and prevent encapsulation of the gel. Therefore, in this DEC application, we would like to focus on characterizing [REDACTED]. In the current study, full thickness wounds will be introduced to mice and treated in a similar manner as our previous studies. Namely, by applying a PIC hydrogel dressing and protecting it with a secondary dressing consisting of Tegaderm and a Bandage. However, wounds will now be followed with histology for a longer period of time (up to one month) and the effect of [REDACTED] will be studied. SPECT/CT imaging will be used once more, specifically to test and quantify [REDACTED]. Such imaging and (immuno)histochemical studies are significantly easier to perform in small animals such as mice. The goal is to show the viability of the complete PIC gel wound dressing technique, involving [REDACTED]. Burns are a complex and very discomforting type of wound, which makes them less desired in this specific study. Therefore, because the goal here is purely to demonstrate the viability of PIC gels as wound dressing, we are convinced that the relatively 'clean' and undisturbed model of wound healing, namely the splinted full thickness wound in mice, is an optimal choice. Successful completion of this study would lead to a new wound dressing product and subsequently will be followed by large animal studies (involving pigs) and eventually phase 1 clinical trials. In addition, it will open doors to new studies involving [REDACTED]

The study proposed here is part of a larger series of studies in the framework of a project with the acronym [REDACTED] that is granted by ZonMW. The project is executed by a consortium of university partners (i.e. the Radboud University, Radboud university medical center, Free University medical center) as well as the Association of Dutch Burn Centres, the Dutch Burns Foundation and the company [REDACTED]. Each of the partners has a specific role in [REDACTED]. The final aim is to develop a passive wound dressing technology for burn wounds and to carry out an initial clinical patient trial (Phase 1) on donor site skin wounds. At the end of the project, the goal of all partners is to have a commercial prototype market ready. In addition, studies will be initiated to develop the gel technology further to allow active participation and intervention in the wound repair process.

Literature:

1. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009) The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. J Int Med Res 37: 1528-1542.
2. Rybarczyk MM, Schafer JM, Elm CM, Sarvepalli S, Vaswani PA, Balhara KS, et al. (2016) Prevention of burn injuries in low- and middle-income countries: A systematic review. Burns 42: 1183-1192.
3. Peck MD (2011) Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. Burns 37: 1087-1100.
4. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN (2009) Burn prevention mechanisms and outcomes: pitfalls, failures and successes. Burns 35: 181-193.
5. Hutchinson JJ, McGuckin M. Occlusive dressings: a microbiologic and clinical review. American journal of infection control. 1990;18(4):257-68.
6. Hanna JR, Giacomelli JA. A review of wound healing and wound dressing products. The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons. 1997;36(1):2-14; discussion 79.
7. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;97(8):2892-923.
8. Gupta B, Agarwal R, Alan M. Textile-based smart wound dressings. Indian J of Fibre. 2010:174-87.
9. Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings - a review. BioMedicine. 2015;5(4):22.
10. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. (2015) Burn wound healing and treatment: review and advancements. Critical Care 19: 243.

11. van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MW, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E, et al. (2009) Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns* 35: 15-29.
12. Hollinworth H, White R. (2006) The clinical significance of wound pain. In: White R, Harding K, editors. *Trauma and pain in wound care*. Wounds UK, 3-16.
13. Kouwer, P. H., Koepf, M., Le Sage, V. A., Jaspers, M., van Buul, A. M., Eksteen-Akeroyd, Z. H., Hoogenboom, R. (2013). Responsive biomimetic networks from polyisocyanopeptide hydrogels. *Nature*, 493(7434), 651-655.
14. Jaspers, M., Dennison, M., Mabesoone, M. F., MacKintosh, F. C., Rowan, A. E., & Kouwer, P. H. (2014). Ultra-responsive soft matter from strainstiffening hydrogels. *Nature communications*, 5.
15. Waring M, Bielfeldt S, Matzold K, Wilhelm KP, Butcher M (2011) An evaluation of the skin stripping of wound dressing adhesives. *J Wound Care* 20: 412, 414, 416-422.
16. Matsumura H, Imai R, Ahmatjan N, Ida Y, Gondo M, Shibata D, et al. (2014) Removal of adhesive wound dressing and its effects on the stratum corneum of the skin: comparison of eight different adhesive wound dressings. *Int Wound J* 11: 50-54.
17. Sapru S, Ghosh AK, Kundu SC (2017) Non-immunogenic, porous and antibacterial chitosan and *Antheraea mylitta* silk sericin hydrogels as potential dermal substitute. *Carbohydrate Polymers* 167: 196-209.
18. Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar PR, Jayakrishnan A (2005) Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 26: 6335-6342.
19. Van Tomme SR, Storm G, Hennink WE (2008) In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm* 355: 1-18.
20. Zeng Q, Han Y, Li H, Chang J (2015) Design of a thermosensitive bioglass/agarose-alginate composite hydrogel for chronic wound healing. *Journal of Materials Chemistry B* 3: 8856-8864.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to undoubtedly show the viability of a wound dressing technique involving the application and removal of thermosensitive PIC hydrogels. Two sub goals have been set in order to reach this objective.

First, the impact of PIC hydrogels on various stages of the wound healing process has to be characterized. To this end, the status of certain wound healing markers will be tested and compared on a histological level between control wounds and PIC gel treated wounds. In addition, the rate of wound contraction is tracked and compared. Thus, the first goal is to investigate the impact of these gels on both the early (inflammatory, proliferative) and late (remodelling, healed) phases of undisturbed wound healing. Any evidence that supports the notion that PIC gels can facilitate or aid in wound healing helps support the ultimate goal of presenting these gels as viable wound dressings, and may help in preventing negative wound healing outcomes in patients.

Second, we want to see if the application and removal method we have envisioned for the PIC gel wound dressings is realistic. In the clinic, this will involve application of the gel [REDACTED] Later, when the dressing requires replacement, the plan is to

[REDACTED]. Thus, in this project, we intend to investigate if this approach is correct. This is achieved by looking at [REDACTED] the [REDACTED], and [REDACTED]). If this study shows that the PIC gels are [REDACTED], and [REDACTED], it will help support the viability of this concept in a clinical setting and may lead to a product that is less painful to patients during dressing changes.

The study from this proposal will be performed by [REDACTED] of the Radboudumc, Nijmegen. We have sufficient past experiences with [REDACTED]. In addition, we are supported by [REDACTED] of the Radboud University [REDACTED] (Nijmegen) and who will supply our PIC gel material as well as actively be involved in the design and performance of the studies. The design of the study is explained further in the next sections.

3.3 Relevance

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

General relevance - Maintain Health, prevent health care:

The envisaged product should prevent infection, resulting in shorter medical treatment, reducing potential fatalities, and should reduce cosmetic and functional problems, thereby significantly decreasing disability-adjusted life years (DALY's) and hospitalization times. The product has the potential to be used by the patient him-/herself thereby reducing hospitalization times, and accompanying costs, even more. The reduction of functional- and psychological problems should result in a better, more active and longer participation in society and less intra- and extramural care.

Societal/economic relevance

In view of the unacceptable loss of functionality, psychological impact, and high morbidity rate following (burn) wounds, the clinical relevance and societal/economic impact of the present project is evident. There is an urgent need to further explore prevention or attenuation of hypertrophic scar formation to prevent cosmetic and functional problems. Elucidating the mechanisms of the customizable PIC hydrogel on the different phases of wound healing is a key research issue, awaiting detailed investigation. We have established valuable collaborations and networks with both clinical and preclinical experts in the field of wound healing, inflammation, and oxidative stress, enabling us to receive various important tools and know-how. Using mechanistic studies, the present project aims to identify the role of the PIC hydrogels in modulating down-stream inflammatory and effector mechanisms. The combined unique expertise from our different partners ranges from basic research, preclinical models, industrial production, to patient treatment and forms a unique opportunity to study the interaction between inflammation, bioactive molecules, and scar formation. It can be envisioned that amelioration of wound repair using the customizable hydrogel results in novel therapeutic targets for the treatment of hypertrophic scar formation. This research has direct important societal relevance.

Scientific relevance

The success of this study is crucial for the continuation of [REDACTED]. The studies our consortium has planned involve [REDACTED]. To justify the start of those studies, it must be proven that the PIC gels can (A) function as wound

dressing, and (B) are applicable and removable as we have intended. Our past studies have already confirmed that PIC gels are [REDACTED], so the current study focuses primarily on confirming that our removal method is probable and efficient.

3.4 Research Strategy

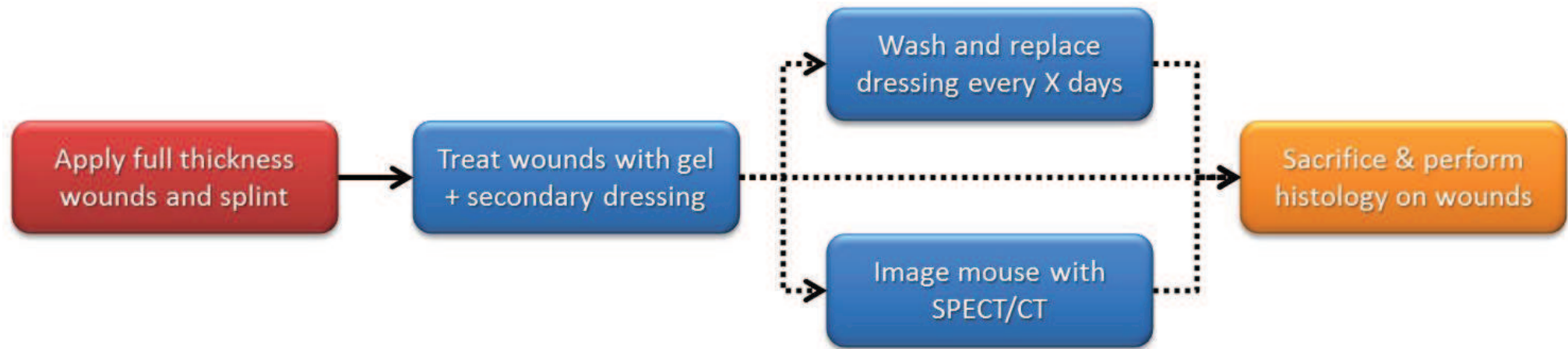
3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

In this study, mice are employed to study the wound healing process of full thickness skin defects that are treated with thermoreversible wound dressing products. All mice are subjected to the same procedure that involves the creation of two identical full thickness skin wounds (with a biopsy punch) in the dorsal skin. The wounds are splinted with a silicone ring that is glued in place around the wound using tissue glue. The purpose of the splint is to prevent wound contraction by primary intention. In further detail, mice possess a subcutaneous muscle layer (the *panniculus carnosus*) that is absent in humans. By including the splint, murine wounds must contract through similar mechanisms as human wounds, namely by epithelial migration, myofibroblast contraction, and collagen deposition. The primary wound dressing is now applied to the wound, which in our case will be a thermoreversible wound dressing product (PIC hydrogel). Because mice tend to clean themselves (and their wounds) thoroughly, a secondary dressing is put in place to shield the gel from outside influences. This dressing consists of a layer of tegaderm (clinically used transparant film dressings) and a gauze/bandage wrap. Wounds are then allowed to heal over time and animals are sacrificed at 3 different time points that allow evaluation of the different phases of wound repair.

In a clinical setting dressing changes are regular (often daily), as wound exudates tend to build up in the dressing over time. To simulate this, we will include a washing group where PIC hydrogel is [REDACTED] and then re-applied repeatedly over the course of the study. The purpose of this procedure is to compare it to groups that [REDACTED] and then evaluate if [REDACTED] can damage the healing wound. In addition, this will tell us if gels are [REDACTED].

We chose for a clean wound healing model (the humanized full thickness wound model) as it is a simple method that is less discomforting than other methods (e.g. burns) that still allows us to answer our research question: namely, if the proposed PIC hydrogel based wound dressing method is viable for clinical studies. This wound model is popular because it demonstrates the major wound healing mechanisms such as epithelialization, contraction, dermal reconstitution, inflammation, chemotaxis, angiogenesis, matrix deposition & organization, and cosmetical outcome [1]. In addition, we choose mice as our animal model because this study involves extensive histological and SPECT/CT analyses. These two analysis methods are significantly easier to perform in the mouse for several reasons. The primary reasons are that a lot of research tools are available for mice (e.g. antibodies for immunohistochemical stainings) and that SPECT/CT imaging is significantly easier in small creatures such as mice (due to the size requirement of the SPECT/CT scanner). Future studies, that will be designed and performed based on the results obtained in the current study, will include [REDACTED].

The flow-chart below summarizes the strategy:



References

1. Wang X, Ge J, Tredget EE, Wu Y (2013) The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. Nat Protoc 8: 302-309.

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

To evaluate the outcome of wound healing we will use two primary readout methods: Tissue characterization (by photography and (immuno-) histochemical stainings) and radio-active imaging (SPECT/CT). For the latter group, special DTPA-conjugated PIC hydrogels are produced and then labeled with In-111 (a radio-active tracer). This allows us to track the presence and quantity of PIC hydrogel within the wounds, as well as the rest of the body, and is primarily used to assess the ability of the gel to stay adherent to the wound as well as the [REDACTED].

The following experimental groups are included:

0) Pilot group.

- 1) An untreated control. Receives only the secondary dressing (to protect the wounds and splints), may be considered 'sham treatment'.
- 2) PIC hydrogel (single application).
- 3) PIC hydrogel which is [REDACTED] replaced repeatedly (every 2-to-4 days).
- 4) PIC-In111 hydrogel.

In groups 1, 2, and 3, histological samples are collected at three important time points. Namely:

- The inflammatory phase (day 3) - shows initial response to the gel, and is marked by presence of inflammatory cells

- The proliferative phase (day 7) - shows the induction of myofibroblast cell types, and the start of collagen production
- The remodeling phase (day 14-to-28) - shows how myofibroblast activity decreases, and collagen structures are actively remodeled into a more durable matrix

We intend to [REDACTED] replace the gel (in relevant groups) every 3 days, so we request a time frame of every 2-to-4 days for more flexibility. It is possible that the secondary dressing (consisting of a Taderm sheet and bandage wrap) may suffer from wear-and-tear and require replacement after a certain time. Thus all animals may have to undergo additional anesthesia moments to carefully refresh these dressings in case it is deemed necessary. A pilot study involving a few mice is performed first, to study the behavior of the mice and the dressings for a period longer than 7 days. In this pilot group we want to simultaneously identify the best third time point for our main study (day 14, 21, or 28). Thus a mouse is sacrificed at day 14, 21 and 28. The best time point is determined based on a few properties. For example, after a long time (28 days) the healing of the wounds may be finished already, making comparison between experimental conditions more difficult. Furthermore, we may find that day 14 is a good moment to assess the state of the remodeling phase. In that case, ending the experiment at day 14 is the best choice as it means animals have to suffer for a shorter amount of time and there are also less handling moments for the researchers. In addition, there are pilot mice that will be used to [REDACTED]

In group 4, histological samples are only collected on the final day. SPECT/CT scans are the primary interest and obtained at intermediate points to track the presence of the gel in or on the mouse. Because animal sacrifice is not required for the intermediate measurements, less animals are required. In this group, radio-active PIC gel is applied on day 0 and the activity is measured with the SPECT/CT scanner. Every 3 days thereafter, the activity on the mouse is scanned once more. Then, the gel is [REDACTED] and the mouse is scanned once more. This shows the [REDACTED]. After the second scan, a new dose of gel is applied and the secondary dressing is replaced. Due to technical limitations with radio-active material (i.e. the physical decay time of In-111 is 2.8 days) this experiment is limited to 9 days. Thus, we plan to scan on day 0, 3, 6 and 9. On each intermediate time point we can assess the current state of activity and decide whether it is feasible to continue on to the next time point.

Anesthesia is applied during all experimental steps (i.e. surgery, dressing changes, and SPECT imaging). Analgesia is applied prior to and after surgery. Photographs taken are whenever it is possible, i.e. when the secondary dressing is not present and the wounds are visible. These moments are right after surgery and sacrifice, as well as during [REDACTED].

Due to the amount of animals and time required for treatment and sacrifice, we plan to perform the experiments in a step-wise manner. We calculated that we need, at the most, 89 mice for these experiments and pilots if we include an additional 10% animals to account for unexpected failures.

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

Each group serves a specific purpose to answer the main research question:

- Group 1 (untreated control) serves as a comparison for the other groups. No PIC gel is applied in these wounds, making it an accurate representation of unimpaired wound healing.

- Group 2 (single PIC gel application group) shows the long-term impact of a single application of the PIC gel wound dressing. The effect on wound histology of a single PIC gel application was investigated previously, but never beyond 7 days. The main purpose of this group is to explain the effects of long-term exposure to PIC gels.
- Group 3 (dressing change group) is similar to group 2, but will instead receive regular dressing changes. This group shows if [REDACTED] steps have a negative impact on the histological state of the wound bed, and also if replacing the gel at intermediate points results in a different long-term outcome than a single application. This group directly mimics how the PIC gel dressings would be applied in a clinical setting.
- Group 4 (radio-active imaging group) aims to both visualize and quantify [REDACTED]. Ideally, the wound dressing is completely removed after [REDACTED]. This group aims to justify our intended clinical application method by showing that gel can indeed be removed and replaced as easily as we postulate.

In group 4, go/no-go moments exist after each time point. On each of these points it can be estimated whether or not the amount of radio-active signal remaining in the PIC gel will be enough to image on the next time point. For day 3 and 6 this is likely, as those points were included and measurable in the previous study (WP 2014-208-009). On day 9, however, the amount of signal might be too low to make an accurate measurement. Thus, on the previous time point (day 6) a calculation will be performed to see if it's feasible to continue on to the final time point (day 9). Ifnot, the experiment is ended prematurely.

However, two pilot experiments are performed first. In the first one, the dressing changes planned for group 3 and 4 are practiced. Simultaneously, mice are kept up to 28 days to identify any unforeseen problems of maintaining our experimental conditions for longer than 7 days. Given our experience with the model so far, we don't expect to encounter any problems that would result in cancellation of the entire experiment. However, we may identify some issues that could lead to modification of our intended plan. For example, if the bandage wrap applied as a secondary dressing does not last beyond 2 weeks (due to physical wear-and-tear), it may mean we have to replace this at intermediate points for all groups. In the second pilot, several washing methods are practiced. The [REDACTED] are all variables that may be tuned to come up with [REDACTED]).

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Full thickness wounds in mice

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Full thickness skin defects are used to mimic typical wounds seen in the clinic. To enhance the wound model and make it more comparable to the human healing process, silicone ring splints are glued around the wounds. The purpose of these splints is to prevent wound contraction by activity of the panniculus carnosus muscle. Contraction may then only occur by epithelial migration and myofibroblast activity (i.e. collagen deposition and wound edge migration), just like in humans. This is called the humanized wound healing model.

To reach the goals set for this project, the status of wound healing has to be compared between groups and at the specified time points. In order to make this comparison, several wound healing parameters have been selected that should allow us to objectively compare these statuses.

(1) Wound contraction rate - By photographing the wound during surgery, and again when the experiment is finished; the contours of the wound can be measured using computer software. This reveals the rate at which wounds contract, and is a measure for epithelial migration and myofibroblast contractile activity. It concerns primarily the proliferation and granulation phases of wound healing (day 7-28).

(2) Inflammatory response - Histological stainings are used to investigate the inflammatory response in the wounds. This is a natural process, but wounds may become infected and foreign materials may trigger a foreign body response. Immuno stainings for macrophages (F4/80 marker) and granulocytes (GR-1 marker) reveal the presence of inflammatory cell types, while general stainings (i.e. H&E staining) show the topography of the wound during the inflammatory phase as well as the presence of giant cells. This parameter concerns mainly the inflammatory phase of wound healing (day 1-6), but will also reveal the presence of a prolonged inflammatory state (i.e. infection) at later time points.

(3) Wound repair status - When damage to the skin is obtained, the lost tissue is repaired with a replacement structure. This structure is built in the proliferation phase and then re-arranged in the granulation phase. Immuno staining for α SMA will show the influx of myofibroblasts (collagen producing cells with a contractile phenotype) as well as the number of bloodvessels (these may increase in number while the wound is being repaired). General stainings are performed to characterize the topography of the wound (i.e. H&E staining) as well as quantitatively and qualitatively assess the amount of collagen replacement structures (i.e. AZAN staining). This parameter primarily concerns the proliferation phase (day 7) and the granulation phase/end result of wound healing (day 10-31).

Characterizing not only the quantity of wound related cells, but also the topographical appearance of the wound is important. In this project, certain groups of mice have their wounds washed and have the wound dressing replaced. We want to investigate if this procedure can damage the wound, and thus both qualitative and quantitative analysis methods need to be employed.

In addition, a SPECT/CT imaging study is included (that follows a similar practical procedure as our pilot study WP 2014-208-009) that involves the use of radio-actively labeled PIC gels. In this group, histological results are only obtained at the final time point. At intermediate time points, the

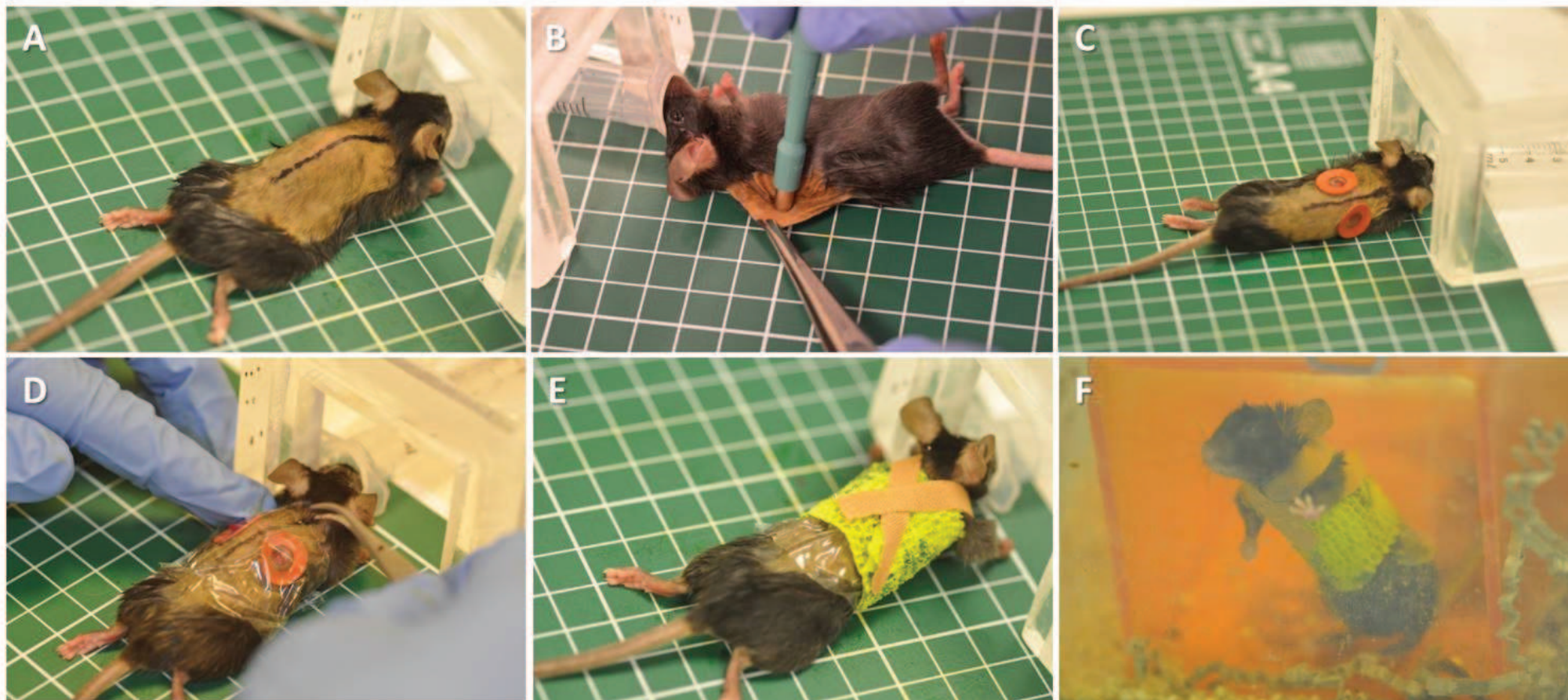
radio-active PIC gels can be located and quantified using a SPECT/CT scanner. This parameter is important, as it is the only reliable method to accurately describe how much gel is still in the wound at specified time points and [REDACTED].

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

Procedure

In this project, we have chosen for the use of the humanized (splinted) full thickness wound model in mice. This model is ideal for our research question for several reasons. First, mice are easy to handle and have quick wound healing. Second, the humanization of the wound by introducing a splint makes the model more comparable to human wound healing. Lastly, full thickness wounds are relatively 'clean' and uncomplicated. This means the wounds will likely heal normally and without complication, making them ideal for studying the effect of our hydrogel wound dressings without interference.

1. The mouse is anesthetized, and then has its dorsal side shaven and disinfected with betadine.
2. The mouse is placed on its side and a fold of dorsal skin is stretched out. A biopsy punch (diameter 4 mm) is used to punch two identical full thickness wounds in the dorsal skin with a single motion. The fresh wounds are photographed.
3. Silicone ring splints may be applied around the wound (thickness 0.5 mm, inner diameter 6 mm, outer diameter 12 mm). These are glued in place using cyano-acrylate tissue glue and will remain there for the remainder of the experiment.
4. In treatment groups, a primary dressing is applied. This is a single topical application of a small volume of thermosensitive gel using a syringe or pipette. A secondary dressing is applied, this consists of a single tegaderm sheet (covers both wounds) and then wrapping the back/belly of the animal in PetFlex bandage. It may then be secured in place with shoulder straps made from petflex or leukoplast tape.
- 5a. Wounds are allowed to heal for a set period of time, so data may be retrieved at different points during the healing process. We do not plan to keep animals in the experiments for longer than 28 days.
- 5b. In [REDACTED] groups: new anesthesia moments may occur during which the mouse is imaged or its wound dressing is refreshed/replaced.
- 5c. In mice that are used for more than 7 days: replacement of the secondary dressing may be necessary when loss of integrity becomes apparent. This requires a new anesthesia moment.
6. At the end of experiment, animals are sacrificed humanely. The wounds are photographed one last time, which will later be useful in determining the size of the wound/scar. Then, the dorsal skin is excised and the (healed) wounds are retrieved by punching them out of the skin sample with a larger biopsy punch (6 mm diameter). The samples are then prepared for histological analysis.



The figure above summarizes the surgical procedure. (A) The animal is shaven and the midline of the dorsal side is marked. (B) By using a biopsy punch, the fold of skin is pierced to create two identical wounds. (C) Silicone ring splints are glued around the wound with tissue glue. (D) A tegaderm sheet is applied around the wound (note: the tegaderm sheet used in this example is slightly too large; a smaller product is available for future use). (E) Petflex is wrapped around the mid section of the mouse and secured in place with shoulder straps (here: made from Leukoplast tape). (F) 7 Days after surgery the mouse is still mobile and capable of reaching up to drink water and eat food, although some mobility is lost (e.g. mice can no longer climb upside down at the ceiling of the cage).

Justification of secondary dressing: It is known that the presence of a bandage wrap around the animal's mid section causes discomfort, and in past studies mice were viewed actively chewing on this dressing and trying to remove it. PetFlex is a specially designed dressing that is self-adhesive (it only sticks to itself) and is resistant to chewing. By applying it firmly, and then securing it in place with additional straps of PetFlex and/or leukoplast

tape it can be ensured that the mouse does not undo its dressing. Natural mice behavior includes thorough cleaning of its body, which includes the back side and any foreign materials (such as the splint). To protect the wound and the primary dressing (i.e. the PIC gel) from the mouse, the secondary dressing needs to be present. To this end, the tegaderm alone does not suffice as mice have been observed chewing on this until it comes loose. Concerns have been raised that the presence of the secondary dressing may influence the results of wound healing. Unfortunately, at this point in research omitting the use of a secondary dressing is not an option. Using mice with splinted wounds and a secondary dressing is the best small animal model that is available, and should provide us with sufficient results to draw conclusions. Later studies (that go beyond the scope of the experiments requested in this DEC) include [REDACTED]. The valid concerns in regards to stress and wound protection offered by the secondary dressings affecting wound healing should be able to be ruled out later during [REDACTED] [REDACTED]). Lastly, it is worthy to note out that current treatments in human also includes the use bandage materials to protect the wound, thus our secondary dressing mimics this in a way.

The secondary dressing may require regular replacement, as wear-and-tear may cause loss of integrity of the dressing. In addition, Tegaderm has an advised limit of 7 days. Thus, the dressing is inspected visually and replaced when deemed necessary. Animals are anesthetized and the secondary dressing is removed carefully to not cause damage or irritation of the skin. During this time, the wounds may be photographed. Depending on the strength of the glue and the quality of the silicone ring splints, these may come loose when the tegaderm removed. They are easily glued back in place with a new application of tissue glue. Then, a fresh sheet of tegaderm is applied and a new layer of Petflex bandage is put in place. This procedure mimics the clinical setting, where dressings also require regular replacement. If dressing replacement does not appear to be required, then we prefer to omit it. If not, then we will aim to refresh it at least every 8 days, or whenever it proves necessary.

[REDACTED]

Experimental groups

Mice be subjected to one of the following conditions:

- 1) An untreated control. Receives only the secondary dressing (to protect the wounds and splints)
- 2) PIC hydrogel (single application).
- 3) PIC hydrogel which [REDACTED] replaced every 2-4 days.
- 4) PIC-In111 hydrogel (for SPECT imaging).

Justification: Group 1 is the control group, and required to place the results of the other groups (primarily group 2 and 3) into context. In group 2, the effect of PIC gel treatment on the wound is investigated for all major phases of the wound healing process. More importantly, this group also serves as an important comparison group for group 3. Moreover, in group 3 the gel is [REDACTED] re-applied, the impact of this procedure on the histological characteristics of the wounds is investigated. Group 2 is thus not only important for identifying the impact of a single gel application treatment, but also to highlight any differences between [REDACTED] (group 3) and [REDACTED]. Lastly, group 4 is crucial

for investigating [REDACTED]. The presence of radio-active PIC gel in the wound [REDACTED] may be quantified and serve as direct measurement for the quantity of gel in the wound.

Pilot studies

Previously, a study was performed (WP 2014-208-009) in which sufficient experience with the wound model and SPECT/CT imaging was obtained. However, we currently do not have experience with keeping mice under these experimental conditions for a period longer than 7 days. Thus, we will first perform a pilot study involving 6 mice. In half of these mice we will apply the primary and secondary dressing to study their integrity for prolonged periods (up to 28 days) (this pilot mimics group 2). In the other half we will practice the dressing replacements proposed for group 3, for up to a maximum of 28 days. In both groups, a mouse is sacrificed at day 14, 21 and finally 28 to assess which time point is most optimal for data collection in the final study. The pilots also serve to identify any unforeseen complications of our experimental setup (dressing integrity, animal wellbeing) beyond 7 days. In addition, we request the use of another 1 to 10 mice to practice and estimate [REDACTED]

[REDACTED] Several *ex vivo* and *in vitro* experiments are already planned to [REDACTED]. However, these models cannot mimic the *in vivo* scenario accurately enough. Thus in these mice full thickness wounds are applied and treated with PIC gel. Several [REDACTED] this gel are practiced that may include protocols with [REDACTED]

[REDACTED] The gel may also be labeled with In-111 (as is explained for experimental group 4) so that [REDACTED]. Knowledge obtained from this pilot will help shape or improve the execution of the complete experiment, and possibly lead to the submission of an amendment to introduce necessary changes.

Data retrieval

Photography will be performed after the wounds are placed, and when the animals are sacrificed.

Later, the size difference between the wounds may be determined to calculate the rate of wound closure. If the protocol allows it (e.g. when dressing changes are included) photographs may also be taken on intermediate days.

Histology is the primary method for data retrieval in this experiment. The harvested wound samples are fixated in formalin and then processed into paraffin sections. Some of the stainings we will perform include:

H&E staining - general structures, and presence of giant cells (hydrogel breakdown response)

AZAN staining - Collagen deposition

F4/80 - Macrophage infiltration

GR-1 - Granulocyte infiltration

αSMA - myofibroblast infiltration and bloodvessel number

Other relevant stainings may later be included, such as ones for determining macrophage phenotype. The number of histological coupes obtained per wound is very high, leaving ample room for additional histological stainings.

For the imaging studies, a SPECT/CT scanner is used to image radio-active In-111 labels. These labels bind to DTPA groups present on the PIC polymer, exactly as in WP 2014-208-009.

Time schedule

Histological study (group 1, 2, 3):

Day 0: Surgery (application of full thickness wounds), treatment with primary (PIC gel) and secondary wound dressing

Day 3: Sacrifice, obtain histological data of inflammatory phase

Day 7: Sacrifice, obtain histological data of proliferation phase

Day 14/21/28: Sacrifice, obtain histological data of granulation phase

■■■■■ dressing every 2-to-4 days in group 3.

SPECT/CT imaging study (group 4):

Day 0: Surgery (application of full thickness wounds), treatment with primary (In-111 labeled PIC gel) and secondary wound dressing, imaging with SPECT/CT

Day 3: imaging with SPECT/CT, ■■■■■, second imaging with SPECT/CT, re-application of primary and secondary wound dressing

Day 6: imaging with SPECT/CT, ■■■■■, second imaging with SPECT/CT, re-application of primary and secondary wound dressing

Day 9: imaging with SPECT/CT, ■■■■■, second imaging with SPECT/CT, sacrifice, harvest of skin for histological data, dissection of mouse for bio-distribution measurement.

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

The necessary sample size per group will be calculated according to the requirements set by the CDL animal facility of the Radboudumc, in Nijmegen, the Netherlands. To this end, experience and data from the previous PIC gel animal studies, as well as literature, will be consulted. By performing a statistical power analysis, we can ensure the bare minimum number of animals are used to achieve our goals.

The sample size can be calculated with Piface statistical analysis software. A two-sample t-test will be employed using data from our previous studies. The difference in mean value and standard deviation of certain wound healing parameters (e.g. wound size in square millimeter, or myofibroblast influx score) can be entered. The group size is also entered, and the statistical power is observed. By adjusting the mean difference, standard deviation, or group size we can see what values are required to achieve a statistical power of 0.8 (the generally accepted minimum requirement). From these values, an optimal group size is selected in which the required mean difference and standard deviation are plausible. Plausibility is achieved in two ways: (1) the values must be achievable, and thus be in comparable value ranges as was observed in previous studies, and (2) the values must be credible, e.g. a significant difference in collagen content of 25% is more plausible than a significant difference of only 2.5%.

Due to the nature of our experimental method, each mice carries two identically sized full thickness wounds. By performing specific statistical analysis, these wounds may be paired up to increase the statistical power. This can lead to a reduction in group size, reducing animal suffering by using a lesser amount of animals in total.

B. The animals

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

Choice of animal model:

Mice were selected as most optimal animal model for the following reasons:

- Relatively quick wound healing allows us to keep animals in experiment for a shorter period of time
- Small size limits material costs and allows easier handling in SPECT/CT scanners
- Literature on mouse wound healing is plentiful
- Many research tools (such as antibodies) are more easily available for mice

Regarding animal strain, the typical laboratory mouse strain C57BL/6n was previously used in these kinds of studies, as its sturdy nature helps in reducing failure rate. However, due to the presence and regrowth of hair we found that these animals are less optimal for applying the bandage and for processing histological results. The use of hair clippers, a razor or epilating cream is also undesired, as it may alter the morphology of the skin and the wound healing process. Thus we performed a literary research and found that the SKH-1 mouse line, offered by Charles river registered breeder, is a good candidate for our studies. This mouse is completely hairless but still immuno competent, thus completely avoiding the problems of hair and shaving. Due to the lack of hair follicles, it was found that the epidermis is slightly thicker and therefore resembles the human skin morphology more closely [1]. In addition, it is written that similarly to humans, follicular keratinocytes in SKH-1 mice are not actively playing a part in wound repair process (in particular re-epithelialization). Lastly, the SKH-1 mice has been described as relatively docile and is less likely to remove and become agitated from its wound dressings. For these reasons, the breeder recommends the SKH-1 strain for wound healing studies. Use of a hairless model such as the SKH-1 mouse will allow us to omit the shaving steps mentioned in the animal procedures.

In regards to gender, previously single gender studies were often employed by our group. Our preference goes to using males only, as hormone balance may play an important part in wound healing and is less fragile in males. Furthermore, it has been written that male mice have a thicker dermis, while female mice have a thicker epidermis and hypodermis [2]. This discrepancy in skin thickness may lead to problems when interpreting the histological data, and thus we prefer to avoid mixed gender studies.

Another good animal model for wound healing studies is the pig. The skin of the pig morphologically resembles that of humans. In addition, the pig has ample skin available in non-crucial locations (i.e. a large dorsal side) and is a robust animal. The dutch burnwound foundation is involved in the performance of such studies, and have experience with applying both burn wounds and scalds to the pig model.

[REDACTED] We currently have only minimal knowledge of the influence of PIC gels on wound healing, and this knowledge is limited to 7 days. Moreover, [REDACTED]. Indeed, the mice is a superior choice for such studies, as positioning the animal inside the scanner is significantly easier. [REDACTED].

Estimation of animal numbers:

The maximum number of animals may be calculated by using a simple estimation method:

Pilot mice (maximum): 16

Number of experimental groups: 3 (histology) + 1 (SPECT/CT)

Estimated maximum group size (histology): 6

Estimated maximum group size (SPECT/CT): 10

Number of time points (histology): 3

Total = $16 + (3 \times 6 \times 3) + (10 \times 1) = 80$ mice

We don't expect to see a lot of failures, and if they do occur we expect no more than 10%. We expect these failures to be mainly caused by premature deaths (e.g. during anesthesia) or collection of data (e.g. mistakes during harvesting and processing of histological data).

$80 / (1 - 0.1) = 80 / 0.9 = 89$ mice will be used at most (rounded up).

References:

1. Bell RR, Dunstan RW, & Khan NK (2007) Skin wound healing in the SKH-1 female mouse following inducible nitric oxide synthase inhibition. The British journal of dermatology 157(4):656-661.
2. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, & Gurtner GC (2011) Surgical approaches to create murine models of human wound healing. Journal of biomedicine & biotechnology 2011:969618.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	Registered Breeder	89	Skeletally Mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Currently, a good model for studying wound healing outside of the body is not available. The wound repair process relies on numerous factors, such as the delivery of cells and nutrients by the blood, that can not be modelled accurately in an *in vitro* setting. Therefore, animal experiments are required to gain insight in the behaviour of the PIC hydrogel and discover any possible negative responses before moving on to human subjects.

Reduction

To calculate appropriate sample sizes, a statistician will be consulted to oversee the power calculations. In addition, by introducing two wounds per animal the statistical power is increased and the total number of animals put into experiment may be lowered.

Refinement

As it is believed that animals of limited cognitive capacity endure less suffering from painful procedures as more advanced animals. Among mammals, the mouse fits this criteria and also poses several other beneficial characteristics. Wound healing is relatively quick in this species, reducing the time required for the experiment. In addition, many tools and literature sources are available for mouse studies, increasing the success rate and quality of the study. Lastly, we always try to obtain the carcasses of already sacrificed animals (from other studies) so that we may practice new techniques. This way, we can reduce our failure rate in our own study.

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

Whenever animals are handled for experimental reasons, namely surgery, dressing changes, or SPECT/CT imaging, they are anesthetized using an evaporated isoflurane and air mixture. Pain medication (analgesia) will also be administered after surgery according to the rules and regulations set by the CDL animal facility, Nijmegen, the Netherlands. Mice are housed individually to avoid fighting between littermates and to prevent damage to the healing wounds. In addition, it is worthy to note that our experimental conditions are considered wound dressings and may help in the treatment of the applied wounds.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

So far, the only animal experiments involving the use of PIC hydrogels as wound dressings have been performed by our own group (RU-DEC 2013-138 (WP 140285) and WP 2014-208-009), as the right to perform these experiments is exclusive to our consortium. The experiments proposed here include several optimizations and extra conditions to make them distinctly different from the previously performed studies. The most notable changes are listed below.

RU-DEC 2013-138 (WP 140285): We now use splinted wounds, whereas the wounds from this study were unsplinted. A secondary dressing is now included to protect the gel from outside factors, such as the mouse itself. An additional time point is included beyond 7 days to investigate the state of wound repair during the granulation phase. And lastly, we now have groups where [REDACTED] to study the effects of wound dressing replacement.

WP 2014-208-009: The current study is a continuation of the imaging study involving In-111 labeled PIC-DTPA. We will now attempt to image wounds [REDACTED], repeatedly over a course of 9 days. Previously, the experiment was limited to 7 days, and the [REDACTED] procedures was not investigated.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

G. Location where the animals procedures are performed

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Both analgesia and anesthesia will be provided and used according to the rules and regulations set by the CDL animal facility, Nijmegen, the Netherlands. Anesthesia is used for all experimental procedures (surgery, dressing changes, imaging), while analgesia is only supplied during/after surgery.

Anesthesia method: Inhalation technique using a mix of evaporated isoflurane and air (induction at 5% ET and maintenance at 2 to 3 % ET).

Analgesia method: Injection with Rimadyl (5 mg/ml, 1 ml/kg) prior to surgery is recommended, with another dose injected 12 to 24 hours post surgery. It is known Rimadyl may affect the inflammatory phase of wound healing and this has an influence on our scientific results. However, we think the animals may benefit from pain medication, and this scenario also resembles a clinical setting in which a patient is giving pain medication after obtaining an injury.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Itching, reduced mobility, stress, discomfort, social isolation.

Explain why these effects may emerge.

Stress is caused by handling, as well as the secondary dressing being constantly in place for the course of the experiment. Anesthesia moments may also result in stress. The presence of wounds not only causes pain, but may also result in itches. Mice have reduced mobility as the result of the secondary dressing, and may be limited in their natural behavior (such as grooming). Mice are housed individually and the resulting social isolation may cause discomfort.

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

To limit the stress induced by the secondary dressing, we will try to apply it carefully and ensure it is tight enough to not become undone, but still loose enough to limit pressure on the mouse's body. In addition, the location for the wounds is chosen specifically to cause minimal discomfort to the animal when its awake (namely, the dorsal skin). Regular checkups by the researchers and biotechnicians are performed to detect any changes in behavior, stress, discomfort, or experimental problems. Lastly, while individual housing is done primarily to protect the wounds from outside influences, it also prevents stress and damage related to fighting between littermates. It is also a pre-emptive countermeasure, as we suspect littermates may seriously influence the wounds (as well as ingest part of the tegaderm or the ring splints) when a dressing of a cagemate becomes undone (by accident).

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

The general humane endpoints of RU apply (see intranetsite of animal welfare officers/lvD). In addition, the following experiment specific humane endpoints will be followed:

-Lack of food and water intake, leading to weight loss or dehydration. If stress and pain levels are too high, the animal may omit feeding. It may also be possible for the secondary dressing to be applied too tightly, preventing the mice from reaching the water and food. Regular weighing should be performed (such as when the mice are being handled for the experimental conditions). A body weight reduction of <15% within 2 days or <20% total is considered significant.

-Severe infection of skin defects. Visual defects that severely compromise wound integrity and/or increase wound size. May be observed when the secondary dressing is replaced.

Indicate the likely incidence.

We expect it is unlikely a humane endpoint will be reached. From past experiences, we noticed the full thickness dermal wounds do not bleed under normal circumstances (unless a larger bloodvessel was hit, and even then the bleeding is minimal). The wounds are properly treated with a wound dressing and are thus unlikely to cause complications. The highest risk lies with the animal's response to the secondary dressing. Thus, the behavior of the animals needs to be carefully monitored so we can intervene at the right moment.

K. Classification of severity of procedures

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

Induction and recovery from anesthesia, as well as the initial surgery, is considered a moderately discomforting procedure. However, the combined discomfort of the wounds, ring splints, secondary dressing, and individual housing results in severe discomfort. Some groups of animals will have to live under these conditions for up to several weeks. During this time, the pain of living with wounds will fade (as the wounds naturally heal) and discomfort may lower. On the other hand, the discomfort of the secondary dressing will persist until the end of the experiment. New anesthesia moments (e.g. ████████████████████) are considered moderately discomforting, but will contribute to the overall severely discomforting conditions.

On the final day of the experiment, animals are sacrificed humanely according to CDL protocol. To this end, suffocation with a CO2/O2 gas mixture is the preferred method. This is a non-recovery procedure. This step is performed without anesthesia, unless the animal was already anesthetized for other reasons (e.g. sacrifice at the end of a planned SPECT/CT imaging session).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Histological characterization of the skin wounds is the main method for data retrieval in this study. Thus, animals are required to be sacrificed in order to retrieve the skin/wound sections.

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

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

☒ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0103
2. Titel van het project: PIC hydrogels for wound dressing purposes
3. Titel van de NTS: Het karakteriseren van nieuwe vloeibare pleisters
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 24-01-2017
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken: 07-02-2017 en 02-05-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 13-02-2017 tot 04-04-2017 en van 08-05-2017 tot 08-05-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 04-04-2017
 - ☒ advies aan CCD: 22-05-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 13-02-2017
 - Datum antwoorden: 04-04-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

-De commissie heeft uitgebreid gecorrespondeerd met de onderzoekers over een eerder ingediende aanvraag waarin de bruikbaarheid van deze PIC hydrogel zou worden onderzocht in dit diermodel. Naar het oordeel van de commissie bleef deze aanvraag, zelfs na twee revisies, van onvoldoende wetenschappelijke kwaliteit. Zij heeft de aanvragers verzocht om zich te beperken tot die experimenten waarmee direct en onomstotelijk kan worden aangetoond dat de gel eenvoudig kan worden aangebracht en weer worden verwijderd zonder het wondbed te verstoren. Immers, een wondbedekker die eenvoudig te vervangen is zou van klinisch voordeel kunnen zijn.

De commissie benadrukt opnieuw dat het gekozen model ernstig ongerief met zich brengt. In de ethische afweging moet hier een zwaarwegend belang tegenover staan. Helaas moet de commissie constateren dat dit niet naar voren komt uit de voorliggende aanvraag.

Ook acht zij de wetenschappelijke kwaliteit nog steeds beneden het gewenste niveau, zoals blijkt uit onderstaande fundamentele vragen en opmerkingen. De commissie kan niet positief adviseren over de huidige aanvraag.

Zij verzoekt de onderzoekers met klem nogmaals te overwegen of de keuze voor dit diervorm wel een juiste is. Indien zij toch op deze weg willen doorgaan zullen zij een zorgvuldig geschreven en goed doordachte definitieve aanvraag in moeten sturen waarin recht wordt gedaan aan alle onderstaande punten.

Antwoord: Het project proposal (PP) is herschreven naar aanleiding van de algemene opmerkingen van de DEC. De aanpassingen in de PP worden hieronder eerst opgesomd, en daarna wordt op de specifieke vragen van de commissie ingegaan.

Aanpassingen PP:

- 3.1 Background: De volgorde is aangepast zodat het klinisch probleem beter (en als eerste) aan de orde komt. Er zijn nieuwe alinea's toegevoegd die bijvoorbeeld de frequentie en problematiek van brandwonden aanduiden, of die het innoverende product vergelijken met bestaande producten. Oude alinea's zijn herschreven om het bericht duidelijker over te brengen. Er zijn extra literatuurreferenties toegevoegd om het onderzoek te ondersteunen, alsmede twee figuren die respectievelijk het klinisch probleem illustreren en door ons behaalde resultaten van in vitro cytotoxiciteit studies laten zien.

- 3.2 Purpose: Het einddoel van het totale project wordt gepresenteerd, waarna de specifieke doelen van de huidige studie vermeld worden. Wij hebben gepoogd uit te leggen waarom die doelen relevant zijn voor het hoofddoel en wat wij gaan doen om deze specifieke doelen te halen.

- 3.3 Relevance: Dit onderdeel is opnieuw geformuleerd om de klinische, economische, en wetenschappelijke relevantie beter aan te geven.

-3.4.1 Research strategy: De eerste alinea is grotendeels onveranderd gebleven. Wij hebben vervolgens een nieuwe alinea toegevoegd waarin onze keuzes voor dit wond- en diervorm worden uitgelegd. In onderdeel 2A van de DAP wordt tevens het wond- en diervorm nogmaals verantwoord en worden er meer details gegeven waarom wij deze keuzes hebben gemaakt.

- 3.4.2 Outline: De opzet van de groepen en de formulering van de bestaande alinea's zijn aangepast. Groep 5 is komen te vervallen, de huidige studie zal zich enkel focussen op de

[REDACTED]. Tevens zijn 2 pilot-experimenten uitgedacht en beschreven (in dit onderdeel en ook in de DAP).

-3.4.3 Coherence: Er wordt nu eerst per experimentele groep gemeld waarom die groep relevant is voor het beantwoorden van de hoofdvraag. Het go/no-go moment dat in onderdeel 4 bestaat tussen de tijdstippen wordt apart uitgelegd. Ook wordt het doel van de twee pilot-experimenten uitgelegd en waarom deze belangrijk zijn voor het verloop van de hoofd experimenten.

Project Proposal:

-3.1: De huidige stand van zaken wat betreft hydrogels die gebruikt kunnen worden om wonden af te dekken is onvoldoende gepresenteerd.

Er bestaan kennelijk al (thermosensitieve) hydrogels die gebruikt kunnen worden om wonden af te dekken: uit de bijlage blijkt dat de PIC hydrogel vergeleken zal worden met de 'thermoreversible Matrigel'.

De noodzaak voor het onderzoeken van juist deze PIC hydrogel is onvoldoende duidelijk.

Antwoord: Om het verschil tussen huidige wondbedekkers en PIC-gels beter te illustreren zijn een aantal positieve en negatieve aspecten van de huidige producten opgenoemd in alinea 4

van onderdeel 3.1. In de tweede helft van deze alinea wordt specifiek ingegaan op hydrogels, en wordt er vermeld in welke aspecten PIC-gels zich differentiëren van deze gels. Hiervoor zijn nieuwe literatuurreferenties toegevoegd.

De vergelijking met andere producten, zoals Matrigel, maakt niet langer deel uit van het in vivo onderzoek. Zoals de commissie heeft voorgesteld; ligt de focus nu enkel op het

██████████ onze eigen ontwikkelde PIC gel, en op het effect van langdurige blootstelling. Voorheen werd Matrigel genoemd omdat het een alom gebruikte thermoreversible hydrogel is (voor cell culture en dierstudies). Echter wordt deze geoogst in een tumorcellijn, waardoor er veel batch-to-batch verschillen ontstaan en het gebruik in mensen wordt afgeraden. In onderdeel 3.1 wordt nog wel een vergelijking met Matrigel gemaakt met betrekking tot cytotoxiciteit (fig. 2), om aan te tonen dat onze PIC-gel vergelijkbaar is met een vaak gebruikt product dat niet toxisch is. Om de uniekheid van PIC-gel beter aan te duiden wordt in paragraaf 4 van onderdeel 3.1 het werk van Zeng et al. gemeld. Deze onderzoekers werken ook aan een thermosensitieve hydrogel voor gecompliceerde wonden, maar gebruiken een materiaal met een volledig omgekeerde temperatuurgevoeligheid (namelijk een gel die geleerd bij afkoeling, niet bij opwarming). In paragraaf 4 en 5 wordt nu verder ingegaan op de positieve eigenschappen die PIC-gels mogelijk bieden als wondverband. Wij willen benadrukken dat huidige behandelingsmethoden niet optimaal zijn omdat veel (brandwonden) patiënten nog steeds last hebben van permanente littekens of andere problemen. Onderzoek naar nieuwe behandelingsmethoden is dus gewenst. PIC-gel is een nieuw product wat de potentie heeft om deze niche vervullen. Wij hebben daarom ook geprobeerd de focus te leggen op het grote aantal positieve eigenschappen die worden aangeboden door de PIC gel, in vergelijking tot de huidige generatie concurrerende producten. Daarvan is ██████████ een belangrijke eigenschap, want dat kan mogelijk leiden tot ██████████.

-3.1: Het klinische probleem is onvoldoende belicht en is, op deze wijze gepresenteerd, niet het uitgangspunt van de studie. De indruk wordt gewekt dat er wordt gezocht naar klinische toepassingen voor de gel: er wordt een probleem gezocht bij een gel, terwijl het klinisch probleem centraal dient te staan. Waarom is een wondbedekker nodig? Waarom zijn de huidige middelen niet adequaat? Hoe groot is de behoefte aan nieuwe middelen die beter werken? Er is een grote hoeveelheid literatuur over 'hydrogel wound dressing' welke onbenoemd blijft.

Antwoord: Onderdeel 3.1 is opnieuw gestructureerd zodat de klinische probleemstelling centraal staat en de achtergrond inleidt. Wij beginnen nu met een uitleg waarom brandwonden vaak in complicaties resulteren (alinea 1). Vervolgens presenteren wij de frequentie van brandwonden, en welke bedragen aan zorgkosten er doorgaans gepaard gaan met de behandeling van dergelijke wonden (alinea 2). Gezien de hoogte van deze bedragen en het feit dat brandwondenpatiënten veel pijn ervaren tijdens het behandelen van hun wonden, en desondanks nog bijna altijd littekens krijgen, stellen wij dat er nieuwe behandelingsmethodes gewenst zijn. Na ons eigen product te introduceren (alinea 3) maken wij een vergelijking met huidige producten (alinea 4), en leggen wij de nadruk op waarom PIC-gels makkelijker te hanteren zijn en de redenen waarom het mogelijk minder pijnlijk is. Daarnaast bezitten PIC-gels de potentie om het genezingsproces te verbeteren en mogelijk permanente schade en littekens te voorkomen. Toekomstig verder onderzoek zal zich hier met name op gaan richten.

- 3.1: De commissie is niet onder de indruk van de resultaten van het beschreven voorwerk. De eerste studie ██████████ terwijl de tweede, zeer beperkte,

studie uitwees dat [REDACTED]. De commissie vraagt zich af hoe deze resultaten als veelbelovend kunnen worden gezien. Zij lijken er eerder op te duiden dat de gezochte positieve eigenschap (makkelijk te verwijderen en opnieuw aan te brengen) een illusie zal blijken.

Antwoord: In onze ogen waren de voorgaande studies juist veelbelovend over het gebruik van PIC-gel als wondbedekker. Wij hebben gezien dat [REDACTED]. De SPECT/CT-studie wees vervolgens uit dat [REDACTED]. Wat wij hier mee willen aangeven is dat de gel [REDACTED]. Wat betreft het verwijderen van de gel: hier is nog geen onderzoek naar gedaan. Wij hebben enkel uit de vorige studie geconcludeerd dat [REDACTED] nu juist één van de hoofddoelen van de huidige studie. Tevens is er op basis van de huidige resultaten [REDACTED]. Om dat te bevestigen wordt in deze studie dan ook een tijdpunt van 14 dagen of later geïncubeerd om langdurige blootstelling te onderzoeken.

-3.4.2: De strategie is nog niet goed doordacht en het feitelijke verloop van het experiment lijkt afhankelijk te worden gesteld van de beschikbaarheid van 'tools' en mensen (p8, regel 1). De commissie acht dit ontoelaatbaar. Een onderzoeksprotocol dient te worden opgesteld op basis van wetenschappelijke overwegingen. De commissie is van mening dat proefdieronderzoek zorgvuldig gepland dient te worden en vervolgens ook exact zo uitgevoerd dient te worden.

De onderzoekers bestuderen deze gel al sinds 2013 in proefdieren. Uiteindelijk heeft dit geresulteerd in een model met ernstig ongerief doordat het nodig blijkt een splint te plaatsen en de romp van de muis volledig in te pakken, waardoor de muizen ook individueel gehuisvest moeten worden. Het design van deze experimenten dient dan ook zeer goed doordacht te zijn. Die vereiste zorgvuldigheid komt niet tot uiting in deze projectaanvraag. Ook wordt onvoldoende duidelijk waarom dit niet in een minder belastend diemodel, bijvoorbeeld in een varken, onderzocht kan worden.

Antwoord: Wij hebben een aanzienlijke tijd besteed aan het opstellen van de experimenten en het optimaliseren van de experimentele parameters met de huidige kennis. Met de beschikbaarheid van tools refereerden wij specifiek naar de beschikbaarheid van de SPECT/CT-scanner (welke ook door andere onderzoekers gebruikt wordt en soms onderhoudt nodig heeft) en de beschikbaarheid van biotechnici in het dierenlab. Dit diende enkel als illustratie van het type overwegingen die gemaakt moeten worden bij de uitwerking en inplanning van het werkprotocol. Om verwarring te voorkomen is het grootste deel van onderdeel 3.4.2 herschreven. Tijds punten worden nu specifiek benoemd en beschreven (zo ook in onderdeel 2A van de DAP). Tevens worden twee pilotstudies beschreven die wij relevant vinden voor de optimalisatie van onze experimentele opzet. Wij hopen hier mee aan tetonen welke wetenschappelijke overwegingen wij maken om de kwaliteit van onze studie te verbeteren.

Betreffende het diemodel en de mate van ongerief: wij hebben extra verduidelijking toegevoegd waarom wij voor deze studie muizen willen gebruiken, i.p.v. bijvoorbeeld varkens. Dit doen wij in onderdeel 3.1, 3.4.1, en onderdeel B van het DAP. Hierbij speelt de afmeting van muizen de belangrijkste rol; wij zijn ervan overtuigd dat condities zoals [REDACTED] beter

gehanteerd kunnen worden in kleine dieren. Tevens zijn varkens te omvangrijk om praktisch te hanteren in een SPECT/CT-scanner en hebben wij reeds ervaring met muizen in deze aanpak. Wij hopen met alle aanpassingen dat in de huidige versie wel naar voren komt dat er goed over de experimentele design is nagedacht.

Description of Animal Procedures:

-A: De noodzaak voor het gebruik van de verschillende onderzoeksgroepen is onvoldoende onderbouwd. Groepen 4 en 5 lijken onnodig om het gewenste doel, het aantonen dat het vervangen van de gel mogelijk is zonder negatieve gevolgen, te behalen.

De vier tijdstippen dienen te worden onderbouwd: is het verstandig een groep van 4 weken te includeren terwijl de, beperkte, huidige ervaring stopt bij 1 week? Voor iedere groep van 6 muizen dient duidelijk en voorafgaand aan het experiment te worden vastgelegd wat zij op welk tijdstip dienen te ondergaan. Dit geldt in het bijzonder voor tijdstippen en frequentie van de vervanging van de gel. Dus níét zoals op p8 van het project proposal wordt gesteld: 'we speculate this step should occur every 3 days or twice per week'. Ook de momenten waarop de secundaire dressing wordt vervangen dienen van te voren worden vastgelegd. Alle handelingen die bijdragen aan het ongerief (aard en frequentie van de handelingen) dienen in deze aanvraag te worden vermeld.

Antwoord: Wij hebben na advies van de commissie de experimentele groepen aangepast. Groep 5 is komen te vervallen en tevens hebben wij besloten dat één tijdstip voorbij 14 dagen voldoende is om conclusies te trekken over de impact van PIC-gel op de lange termijn. Om een beter beeld te krijgen van het histologische uiterlijk van de wond op dag 14, 21 en 28 wordt een pilotexperiment uitgevoerd waarbij dieren op die dagen worden opgeofferd. Hieruit moet blijken welk tijdstip uiteindelijk optimaal gaat zijn voor het beoordelen van wonden in de granulatie fase (laatst fase van wondgenezing) in de hoofdstudie. Tevens is er een pilot groep beschreven voor [REDACTED]. Er is een tijdslijn toegevoegd voor groep 1, 2 en 3 en een aparte voor groep 4. Voor [REDACTED] melden wij een tijd bereik van 2 tot 4 dagen. Door het uitvoeren van een pilotstudie kunnen we dit bereik verder specificeren (b.v. elke 3 dagen), maar biedt het ons alsnog flexibiliteit mocht dit nodig zijn. De frequentie van het vervangen van de secondary dressing wordt nu in onderdeel 2A uitgelegd.

-K: Het cumulatief ongerief is ernstig voor alle dieren: zij worden ingepakt en individueel gehuisvest.

Antwoord: Na overleg met de commissie hebben wij besloten cumulatief ernstig ongerief te hanteren, dit is in de DAP (onderdeel K) en de NTS (onderdeel 3.5) aangepast.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Het aantal dieren en de ongerief score in de NTS is aangepast aan de hand van de aanpassingen in het PP en DAP.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

- Datum vragen: 08-05-2017

Datum antwoorden: 08-05-2017

Project Proposal:

3.4.1: De aanvragers vermelden aan het eind van deze paragraaf: 'Future studies, that will be designed and performed based on the results obtained in the current study, will include [REDACTED] [REDACTED].' De DEC leidt hieruit af dat [REDACTED] [REDACTED] pas zullen worden uitgevoerd als de resultaten van de voorliggende studie bekend zijn. Kunnen de aanvragers bevestigen dat dit juist is?

Antwoord: Dit betreft [REDACTED] die zullen worden uitgevoerd door de Vrije Universiteit Medisch Centrum Amsterdam. Deze studie legt de focus op [REDACTED] [REDACTED]. De onderzoekers in Amsterdam wachten inderdaad op ons advies over het hanteren van de gel. Dit advies [REDACTED] [REDACTED]. Dit laatste wordt in de huidige studie (DEC 2016-0103) onderzocht. De onderzoeksgroep in Amsterdam zal dan ook niet met hun studies beginnen totdat zij onze bevindingen over het gebruik van en reactie op de gel hebben ontvangen.

- De antwoorden hebben niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project van beperkte omvang. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te onderzoeken of PIC hydrogels bruikbare wondbedekkers zijn, waarbij de aanvrager focust op het effect dat deze hydrogel heeft op de verschillende stadia

van het wondgenezingsproces, en op de vraag of de hydrogel [REDACTED] [REDACTED] Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een hydrogel die de wondgenezing ondersteunt en minder pijn en beschadiging van het wondbed veroorzaakt bij het verwijderen. PIC hydrogels hebben unieke eigenschappen waardoor zij een goede wondbedekker zouden kunnen zijn. Wanneer blijkt dat de PIC hydrogel inderdaad [REDACTED]

[REDACTED], dan zal deze gel in vervollexperimenten verder worden onderzocht. De onderzoekers denken daarbij [REDACTED]

[REDACTED]. De DEC is van mening dat er binnen dit project nog geen directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de toepasbaarheid van PIC-hydrogels voor toepassing als wondbedekker nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe wondbedekkers die het genezingsproces minder verstoren en makkelijker vervangen kunnen worden, en dat er met name behoefte is aan dergelijke wondbedekkers voor de behandeling van brandwondenpatiënten. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe wondbedekkers die het genezingsproces beter ondersteunen en makkelijker vervangen kunnen worden. Met name brandwonden patiënten zouden hierbij gebaat kunnen zijn, omdat het een vermindering van littekenvorming zou kunnen betekenen en de wondverzorging minder pijnlijk zou worden. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor brandwondenpatiënten, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
 - ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - ☐ Zwerfdieren (10h)
 - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
 - ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn niet conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden individueel gehuisvest, hetgeen noodzakelijk is voor het slagen van de experimenten. De dieren kunnen elkaar wel zien, horen en ruiken. De DEC is van mening dat er voldoende reden is voor individuele huisvesting, en dat de aanvrager er alles aan doet om het ongerief van individuele huisvesting zoveel mogelijk te beperken.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt vooral veroorzaakt door het aanbrengen van de folie rondom de romp om te voorkomen dat de muis de gel verwijdert. De commissie is van mening dat dit in combinatie met de overige handelingen en individuele huisvesting leidt tot ernstig ongerief voor de dieren.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het aanbrengen van de siliconen spalken op de rug, die noodzakelijk zijn om de aangebrachte wonden open te houden. Om te voorkomen dat het dier de gel uit de rugwonden likt wordt folie rondom de romp aangebracht. Het dier wordt hierdoor gehinderd in zijn normale gedrag en de zelfredzaamheid neemt af. Er zullen haarloze muizen gebruikt worden, omdat hun huid meer op de huid van mensen lijkt en hun huid niet geschoren hoeft te worden voor de experimenten. De integriteit van deze dieren is aangetast, omdat zij geen vacht hebben.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met dit diermodel ingeschat. Op basis daarvan kan gezegd worden dat het onwaarschijnlijk is dat een dergelijke situatie zich zal voordoen. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Wondgenezing is een complex proces waarbij verschillende factoren, zoals cellen en nutriënten uit het bloed, betrokken zijn. Er is nog geen goed proefdiervrij alternatief beschikbaar om wondgenezing te bestuderen.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog

een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit pilots worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De huid van een muis komt voldoende overeen met menselijke huid, waardoor de resultaten van wondgenezing vertaald kunnen worden naar de humane situatie. De dieren zullen met name veel ongerief ondervinden van de folie die rondom de romp wordt aangebracht. Dit is echter onvermijdelijk om het doel van dit project te bereiken. De DEC heeft expliciet gevraagd naar de mogelijkheden om een groter diermodel, zoals het varken, te gebruiken waarbij het niet nodig is om de romp van de dieren in te pakken. De DEC is er van overtuigd dat dit voor het huidige onderzoek praktisch niet realiseerbaar is. Voor de handelingen waarvoor dit vereist is, zullen de onderzoekers adequate pijnstilling geven. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: 'De voorkeur gaat uit naar het gebruik van alleen mannelijke dieren, omdat hormoonbalans een belangrijke rol in wondgenezing zou kunnen spelen. Bovendien verschilt de huidopbouw tussen mannelijke en vrouwelijke muizen, waardoor er problemen zouden kunnen ontstaan bij het interpreteren van de histologische data. Daarom willen we liever geen studies met beide geslachten doen.' De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om het huidweefsel te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een ernstige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van

hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Ernstige littekenvorming, zoals die bijvoorbeeld kan ontstaan bij de genezing van brandwonden, kan leiden tot functiebeperkingen van ledematen en kan grote psychologische effecten hebben. De resultaten van dit project zullen duidelijk maken of de onderzochte nieuwe wondbedekker het wondgenezingsproces beter kan ondersteunen en eenvoudiger te vervangen is. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe wondbedekkers die de wondgenezing beter ondersteunen van substantieel belang. Deze experimenten leveren daaraan naar het oordeel van de commissie een beperkte, maar noodzakelijke, bijdrage door uitsluitel te geven over de vraag of deze hydrogel daarvoor een geschikte kandidaat is.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: onderzoeken of PIC hydrogels bruikbare wondbedekkers zijn. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een hydrogel die de wondgenezing ondersteunt en minder pijn en beschadiging van het wondbed veroorzaakt bij het verwijderen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen
 - ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - o Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - o Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - o De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - o De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - o De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

T.a.v. [REDACTED]

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171825

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 mei 2017. Het gaat om uw project "PIC hydrogels for wound dressing purposes". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171825. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

23 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171825

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171825

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171825

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- ☐ Een projectvergunning aanvragen
- ☐ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- ☐ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- ☒ Alle bovenstaande opties

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 juni 2017
Geplande einddatum: 1 juni 2021
Titel project: PIC hydrogels for wound dressing purposes
Titel niet-technische samenvatting: Het karakteriseren van nieuwe vloeibare pleisters
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:

23 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171825

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: [x] Projectvoorstel
[x] Beschrijving Dierproeven
[x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: [x] Melding Machtiging
[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 23 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171825

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 mei 2017

Vervaldatum: 22 juni 2017

Factuurnummer: 171825

Ordernummer: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171825	€ 1035,-

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

- U geeft in uw aanvraag aan van plan te zijn alleen mannelijke dieren te gebruiken. U geeft aan dat de huidopbouw van mannelijke en vrouwelijke dieren verschillend is en dat dit kan leiden tot problemen bij de interpretatie van histologische data. Kunt u aangeven op welke wijze dit zou leiden tot problemen en of het gebruik van beide geslachten ook zou leiden tot een toename van het benodigd aantal dieren. Mocht u van mening zijn dat het gebruik van beide geslachten zou leiden tot een toename van het aantal dieren, dan wordt u verzocht aan te geven waaruit dit blijkt.

Antwoord:

In onze aanvraag worden twee redenen gegeven voor het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren. De eerste reden betreft de invloed van hormonen. Het is bekend dat vrouwtjes gevoeliger zijn voor fluctuaties in de hormoonspiegel dan mannetjes. Het is niet ondenkbaar dat het ongerief en stress die door het experiment worden veroorzaakt de hormoonspiegel kunnen beïnvloeden. Aangezien bepaalde hormonen, zoals oestrogeen, de wond genezing kunnen beïnvloeden is het beter om zo veel mogelijk fluctuatie hier in te voorkomen [1,2]. Door zo min mogelijk variatie in de dieren te nemen (d.w.z. enkel mannetjes die over het algemeen stabiel zijn), kan de invloed van ons eigen materiaal (en dus het doel van het onderzoek) beter onderzocht worden.

De tweede reden is dat het gebruik van twee geslachten tot problemen kan leiden bij het vergelijken van de resultaten. Onderzoek heeft aangetoond dat de epidermis van vrouwelijke muizen tot wel 40% dikker kan zijn, en de hypodermis maar liefst 1100% [3]. De dermis in mannetjes is daarentegen 190% dikker dan die van vrouwtjes. In ons onderzoek wordt zowel de algemene structuur van de helende wonden onderzocht als de dikte hiervan gekwantificeerd (b.v. het totaal percentage van collageen in de helende huid). Als een van de onderzoeksgroepen vanwege randomisatie bijna uitsluitend mannetjes bevat, en de andere groep bijna uitsluitend vrouwtjes, dan kunnen er verschillen in de hoeveelheid collageen gemeten worden. Deze verschillen zijn dan geattributeerd aan het geslacht van de muizen, en niet aan het effect van onze experimentele condities. Dit probleem kan gemakkelijk worden voorkomen door muizen van hetzelfde geslacht, leeftijd en gewicht te gebruiken.

Vanwege bovenstaande redenen zijn wij van mening dat het gebruik van twee geslachten zal leiden tot problemen bij de interpretatie van de resultaten, en daarmee de kwaliteit van het onderzoek doen afnemen. Daarnaast zal het gebruik van twee geslachten ook leiden tot een toename in het aantal dieren dat voor de proef nodig is. Namelijk, om te compenseren voor variaties in huiddikte die door geslacht geïntroduceerd worden moet de groepsgrootte vergroot worden. Als de groepen groot genoeg zijn, kan men met redelijke zekerheid aannemen dat de distributie van mannetjes en vrouwtjes gelijk is en alle resultaten op een eerlijke manier beïnvloed worden. Het onnodig vergroten van de groepsgrootte is niet gewenst.

1. Ashcroft GS, Dodsworth J, Boxtel EV, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, et al. (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat Med* 3: 1209-1215.
2. Hardman MJ, Ashcroft GS (2008) Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biology* 9: R80.
3. Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F (2005) Gender Differences in Mouse Skin Morphology and Specific Effects of Sex Steroids and Dehydroepiandrosterone. *Journal of Investigative Dermatology* 124: 22-27.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020171825

Bijlagen

1

Datum 7 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "PIC hydrogels for wound dressing purposes" met aanvraagnummer AVD1030020171825. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 1 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 31 mei 2017 hebben wij u gevraagd het gebruik van alleen mannelijke dieren toe te lichten. Wij kunnen ons vinden in uw toelichting.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "PIC hydrogels for wound dressing purposes" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 juni 2017 tot en met 1 juni 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Datum:

7 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171825

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



M. G. de Feiter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
7 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171825



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres:

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 juni 2017 tot en met 1 juni 2021, voor het project "PIC hydrogels for wound dressing purposes" met aanvraagnummer AVD1030020171825, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. Voor de uitvoering van het project is verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 1 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Full thickness wounds in mice				
	Muizen (Mus musculus) /	89	100% Ernstig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juni 2022 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Aanvraagnummer:
AVD1030020171825

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



Aanvraagnummer:

AVD1030020171825

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD1030020171825

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 blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.