

<b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b>										
		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>				
<b>nr.</b>	<b>document NTS 2017853</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>10.1.c</b>	<b>10.2.e</b>	<b>10.2.g</b>	<b>11.1</b>	
1	Aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Project proposal				x	x	x	x		
4	bijlage animal procedure 1			x						
5	bijlage animal procedure 2				x	x	x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	brief aanhouden ivm vragen CCD				x		x			
8	mail DEC ivm aanvullende vragen				x		x			
9	brief reactie op vragen				x		x			
10	DEC advies				x		x			
11	Advies CCD aan bestuur		x							x
12	Beschikking				x		x			



06 FEB. 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11400
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	64156338
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>	Straat en huisnummer	de Boelelaan 1117
		Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	[REDACTED]
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	[REDACTED]
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker in opleiding
		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] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | [REDACTED] |   |
| Afdeling                    |            |   |
| 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 | 1-4-2017 |
| Einddatum  | 1-4-2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe therapieën voor verbeterde wondgenezing
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres   | [REDACTED]                                  |
|             | Amsterdam   Nederland                       |
| E-mailadres | [REDACTED]                                  |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287,-

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 1.3 opgegeven rekeningnummer.*

\* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer:

Factuuradres:

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Amsterdam

1 - 2 - 2017



## Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

### 1 Gegevens aanvrager

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

Naam van de portefeuillehouder [REDACTED]  
KvK-nummer 64156338  
NVWA deelnemernummer 11400

### 2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.

KvK-nummer [REDACTED]  
 BSN [REDACTED]

- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde [REDACTED]  
Adres of postbus [REDACTED]  
Postcode en Plaats [REDACTED] Amsterdam

Dhr.  Mw.

### 3 Inhoud machtiging


- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?  Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.  
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?  Ja > Ga door naar vraag 4  
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u 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

### 4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde 

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening  
portefeuillehouder  
van de instelling

Handtekening  
gemachtigde





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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



Dit projectvoorstel beoogt nieuwe therapieën te ontwikkelen voor de verbetering van wondgenezing van verschillende type wonden.

Er zijn twee subdoelen in dit project: 1. de bescherming van wonden tegen binnendringende bacteriën en 2. Het bevorderen van (de snelheid van) genezing.

Deze beide doelen gelden zowel voor acute wonden als voor chronische wonden.

Acute wonden zijn onder te verdelen in brandwonden en excisiewonden als model voor chirurgische wonden. Beide modellen zullen in dit onderzoek gebruikt worden omdat deze type wonden verschillen in de specifieke ontstekingsreactie en daardoor ook een specifiek genezingsproces hebben.

Bij deze wonden veroorzaken binnendringende bacteriën vaak complicaties. Door middel van nieuwe wondbedekkers willen we onderzoeken of we dit kunnen tegengaan zonder de kwaliteit van wondgenezing aan te tasten.

Voor chronische wonden gebruiken wij diabetische ulcers als model. Deze wonden genezen over het algemeen niet of heel traag. In dit deel van het project gaan wij middelen testen om de genezing te bevorderen, en vergelijken we diabetische wondgenezing met fibrotische en 'normale' wondgenezing.

type wond	dier	wond type	"voorbehandeling"	kenmerk
acute wonden	varken	brandwonden		<u>excessieve</u> fibrose
	varken	excisiewonden		"normale" genezing
	muis	excisiewonden	<u>Bleomycine</u>	<u>excessieve</u> fibrose
	muis	excisiewonden		"normale" genezing
chronische wonden	muis	excisiewonden	diabetische muizen	vertraagde genezing

Uiteindelijk worden deze twee methoden gecombineerd en worden de beste middelen om genezing te bevorderen toegediend in combinatie met de beste nieuwe wondbedekker.

De verschillende wondtypen hebben specifieke kenmerken en daarom hebben de verschillende wondtypen ook een wond-specifieke behandeling nodig.

Met het ouder worden van de bevolking nemen de problemen met chronische wonden toe. Momenteel lijdt circa 1 – 2% van de wereldbevolking aan een of meer chronische wonden. Diabetes type 2 is hierbij een belangrijke co-morbiditeit.

Bij het genezingsproces spelen de ontstekingsreactie en de daarbij behorende groeifactoren een belangrijke rol. Chronische wonden laten een verstoorde ontstekingsreactie zien en een veranderd groeifactor profiel.

Wij gaan testen of we door specifieke groeifactoren die aanwezig zijn in bloedplaatjes toe te voegen de genezing kunnen bevorderen en tevens littekenvorming kunnen tegengaan.

Acute wonden zoals chirurgische wonden, bijvoorbeeld als gevolg van het uitsnijden van huid tumoren, genezen vaak met de vorming van littekens. Ook minder diepe wonden zoals donorsites voor huidtransplantaten kunnen een verstoorde genezing reactie laten zien bijvoorbeeld als gevolg van binnendringende bacteriën.



Een ander type acute wond is de brandwond. Dit kan een gedeeltelijk diepe wond zijn, een wond waarbij een deel van de lederhuid nog intact is of een volledig diepe wond waarbij de hele lederhuid is aangedaan. Brandwonden onderscheiden zich van andere acute wonden door een sterke ontstekingsreactie. Jaarlijks worden in Nederland circa 1500 mensen in een ziekenhuis opgenomen met brandwonden, daarvan overlijdt ieder jaar nog 4% aan hun verwondingen of bijkomende complicaties (Dokter 2014). Patiënten die wel overleven, kampen vaak met grote ontsierende littekens die functionele beperkingen met zich mee kunnen brengen. Zeker bij jonge kinderen, op dit moment relatief de meest vertegenwoordigde groep patiënten met brandwonden, leveren littekens problemen op tijdens de groei. Vaak is reconstructieve chirurgie nodig om de hinder die patiënten hiervan ondervinden te verminderen. Uit eerdere studies blijkt dat de tijd die nodig is voor het sluiten van de wond, de re-epithelialisatie, een belangrijke factor is die de uiteindelijke kwaliteit van het litteken bepaalt. Dit hangt o.a. samen met de diepte van de wond. Wonden die er langer over doen om te re-epithelialiseren, laten bijvoorbeeld meer contractie zien dan wonden die sneller genezen. Het ontwikkelen van nieuwe wonddressings en/of huidsubstituten blijft dan ook noodzakelijk om de wondgenezing verder te optimaliseren, om littekenvorming na brandwonden te verminderen.

In dit onderzoek zullen we alle typen acute wonden onderzoeken: excisie wonden (partiële en volledig diepe) en brandwonden (partiële en volledig diepe).

Om de effecten van de te onderzoeken producten op fibrose (littekenvorming) te onderzoeken gebruiken we ook een model waarin fibrose van de huid wordt opgewekt m.b.v. bleomycine.

De ontwikkeling van nieuwe wond-specifieke behandelingsmethoden die de wondgenezing kunnen bevorderen en gelijktijdig de toedieningsmethode verbeteren zal bijdragen aan de vermindering van een belangrijk maatschappelijk probleem. Daarmee kan potentieel een grote gezondheidswinst geboekt worden en dus kostenreductie bereikt worden in de gezondheidszorg. Dit project beoogt deze beide aspecten aan te pakken.

#### a) Plaatjes-rijk plasma producten

Plaatjes-rijk-plasma (PRP) wordt steeds vaker gebruikt bij de behandeling van acute en chronische wonden. PRP wordt verkregen uit bloed van de patiënt zelf doormiddel van centrifugatie. Hierdoor worden de bloedcellen gescheiden van de het plasma. Bloedplaatjes bevatten veel groeifactoren, die een belangrijke rol spelen bij de wondgenezing. Algemeen doel bij de behandeling met PRP is het stimuleren van (snelheid van) epithelialisatie, en soms wordt ook pijnbestrijding en/of antibacteriële werking beschreven. Door het gebruik van veel verschillende methoden om dit PRP te produceren is de samenstelling van het product erg variabel, bovendien kan de onderliggende ziekte of het trauma van de patiënt een effect hebben op de aantallen en de kwaliteit c.q. samenstelling van de inhoud (groeifactoren) van de bloedplaatjes (Ferreira 2006). Hierdoor kunnen de resultaten van de diverse studies moeilijk met elkaar vergeleken worden. Bovendien is er nog weinig inzicht in de optimale samenstelling van PRP voor de specifieke wondtypen.

Wij richten ons daarom op het ontwikkelen van een gestandaardiseerd PRP voor de verbetering van wondbehandeling. Wij gaan uit van allogene materiaal (materiaal niet van de patiënt afkomstig), zodat we een zo constant mogelijk product kunnen ontwikkelen om verschillende wondtypen te kunnen behandelen. Dit wordt lokaal, dus direct op de wond, toegediend in de vorm van een gel of crème. Allereerst hebben we de diverse in de literatuur gebruikte vormen van

PRP geanalyseerd m.b.t. de samenstelling van deze producten qua trombocyten, erythrocyten en leukocyten aantallen en de concentratie van verschillende componenten die betrokken zijn bij wondherstel, zoals groeifactoren, fibrinogeen en fibronectine. Momenteel worden deze producten getest in celkweken van fibroblasten en keratinocyten. Bij deze experimenten is gekeken naar proliferatie, migratie en differentiatie. Aanvullend worden in in vitro en ex vivo wondmodellen de wondgenezing bevorderende aspecten onderzocht.

De beste producten uit de in vitro testen zullen worden toegepast in verschillende diermodellen. Muizenmodellen zullen worden gebruikt om de effecten op de genezing te bepalen. Hiervoor gebruiken we diabetisch muizen als chronische wondmodel (Park et al., 2014) en met bleomycine behandelde muizen als acuut (fibrotisch) wondmodel (Usategui et al., 2014) en normale muizen (controle dieren). Vervolgens zal in het varkens model ook nog de toedieningsmethode worden onderzocht. In de verschillende diermodellen worden standaard brand- of excisie-wonden geïnduceerd, die met de geselecteerde PRP producten worden behandeld en geanalyseerd worden op wondgenezingsparameters. De PRP-producten zijn ontdaan van de immunogene componenten, dus verwachten wij geen afstotingsreactie in de muizen.

Het onderzoek zal daarmee resulteren in een optimale bereidings- en toedieningsmethode van allogene PRP voor gebruik bij de behandeling van zowel acute (fibrotische) als chronische wonden. De resultaten zullen de basis vormen voor gerandomiseerde klinische trials om het gebruik van PRP van een 'black box' benadering naar een goed gedefinieerde, evidence-based, medische technologie voor wondbehandeling te brengen.

b) █████

Naast het bevorderen van de wondgenezing is het ook van belang dat infecties met microorganismen voorkomen worden. Het oppervlak en/of de locatie van wonden maken het soms lastig om het wondbed goed af te sluiten van de omgeving, en daarmee het binnendringen van bacteriën te voorkomen. Het aanbrengen en weer verwijderen van dressings en verbandmaterialen kan ervoor zorgen dat het wondgenezingsproces verstoord en daardoor vertraagd wordt. Bovendien is dit proces, dat veelal dagelijks herhaald moet worden, arbeidsintensief en pijnlijk.

Een recentelijk ontwikkeld prototype van een nieuw soort hydrogel, █████, biedt unieke eigenschappen als dressing voor acute en chronische wonden. De formulering van █████ is zo samengesteld dat deze een gelvorm aanneemt bij een temperatuur van meer dan 20°C. Dit maakt het mogelijk om █████ op de wond te sprayen, waarna zich vrijwel direct een hydrogel vormt. Hierdoor voegt de gel zich optimaal naar het wondbed, ook als de wond een onregelmatige vorm en diepte heeft. Hierdoor wordt voorkomen dat bacteriën het wondbed kunnen binnendringen. De gel zal het wondbed wel afschermen van de omgeving, maar blokkeert niet het uittreden van vocht zodat er geen oedeem vorming plaats vindt onder de gel. Onderzocht zal worden in welke mate en hoe lang █████ in staat blijft het binnendringen van bacteriën te voorkomen in een wondmodel in het varken. Voor dit onderzoek zullen uitsluitend acute wonden aangebracht worden. Idealiter zal door toepassing van █████ de frequentie van noodzakelijke verbandwissels teruggebracht kunnen worden.

c) Combinatie van PRP-product met █████

De optimale PRP formuleringen zullen gecombineerd worden met de optimale █████ formulering en het effect op de genezing van de wond zal hierbij bestudeerd worden. Hierbij zal onderzocht

worden welke dosis PRP-product het meest optimale effect op de genezing van de wonden heeft. De meest effectieve formulering zal vervolgens klinisch getest worden.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het hoofddoel van deze experimenten is nieuwe strategieën te ontwikkelen voor de genezing van complexe wonden door het stimuleren van het genezingsproces van chronische en acute (fibrotische) wonden en het vermijden van bacteriële complicaties. Hierbij wordt onderzocht welke componenten het product wel of juist niet moet bevatten en hoe het moet worden aangebracht. Een snelle sluiting van de wond kan leiden tot een betere kwaliteit van het litteken, daarnaast is er minder kans op infecties door bacteriën. Bacteriële infecties leiden tot vertraging of zelfs uitblijven van de wondgenezing, waardoor littekens of chronische wonden kunnen ontstaan. Het reduceren van de frequentie van verbandwissels is een secundair doel, dat potentieel een grote vermindering van pijn en gerelateerd trauma voor de betrokken patiëntenpopulatie tot gevolg heeft en bijdraagt aan reductie van werklust voor verplegend personeel.

De middelen die getest worden zijn een allogeen gestandaardiseerd PRP product en een nieuw type wond gel; ██████████

De volgende subdoelen zijn voor het project geformuleerd:

PRP

- Wat is de optimale samenstelling van een PRP product voor de verbetering van wondgenezing van acute, fibrotische of chronische wonden?
- Op welke manier kunnen PRP componenten het beste op de wond aangebracht worden?
- Welke behandel frequentie (bijvoorbeeld eenmalig of meerdere keren per week) is nodig om de wondgenezing te verbeteren?

██████████

- Is ██████████ in staat een acute wond (excisie- of brandwond) goed af te beschermen tegen bacteriële infecties
- Is ██████████ in staat de juiste wondomgeving te creëren.
- Hoe lang blijft ██████████ zijn barrière functie behouden.
- Is ██████████ effectief op een brandwond met brandwondkorst.
- Kan ██████████ gebruikt worden in combinatie met een huidtransplantaat.
- Kan ██████████ gebruikt worden als tijdelijk wondbedekker

Combinatie PRP en ██████

- Kunnen PRP-componenten aangebracht worden in combinatie met ██████ zodanig dat beide hun optimale werking behouden en welke dosering PRP is daarvoor nodig?

Haalbaarheid: Binnen de groep is ruime ervaring ██████  
██  
██  
██  
██  
██  
██  
██

PRP en ██████ zullen reeds uitgebreid getest zijn op ex vivo huid en in organotypische kweek, zodat globale gegevens met betrekking tot effect op verschillende celtypen die betrokken zijn bij de wondgenezing bekend zijn ruim voor aanvang van de proeven. Omdat de wondomgeving in intacte organismen verschilt van het in vitro model (bv de ontstekingsreactie) dient er in proefdieren getest te worden voordat deze middelen in de mens toegepast kunnen worden. In het PRP project werken wij samen met een onderzoeksgroep die gespecialiseerd is in bloedproducten, deze onderzoeksgroep heeft eveneens expertise met het werken met muizen. In het ██████ project wordt samengewerkt met de onderzoeksgroep die de gel ontwikkeld heeft. Binnen deze groep is eveneens expertise aanwezig met het testen van materialen voor wondgenezing in cavia's, muizen en ratten.

---

### 3.3 Belang

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

Momenteel zijn er geen goede behandelingen, die de wondgenezing van mensen met acute of chronische wonden versnelt. Het gebruik van de groeifactoren uit bloedplaatjes is veelbelovend. Bij succesvolle afronding, zal er verder getest worden in mensen door middel van een klinische en gerandomiseerde studie. Dit zou kunnen leiden tot een nieuwe evidence-based behandelstrategie voor mensen met acute en chronische wonden.

Het voordeel van het gebruik van een allogene plaatjes-rijk plasma product is dat hiermee de belasting om PRP te maken (i.e. bloedafname) verlegd wordt van de patiënt naar een donor, die dit vrijwillig afstaat. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat bij sommige onderliggende aandoeningen de bloedplaatjes niet optimaal zijn om PRP te maken. Daardoor kan bij een autoloog product niet makkelijk een gestandaardiseerd product gemaakt worden. De samenstelling van het bloed en de concentratie/kwaliteit/eigenschappen bloedplaatjes kan per patiënt sterk verschillen.

Bovendien maken de huidige behandel technieken veelvuldige verbandwissels noodzakelijk om het gevaar van bacteriële infecties te verlagen. Met name patiënten met brandwonden vinden deze dagelijkse verbandwissels zeer belastend en pijnlijk.

Eerder onderzoek, gedocumenteerd in verschillende publicaties, met deze diermodellen heeft aangetoond dat de resultaten goed te vertalen zijn naar de mens. In het verleden hebben wij en anderen aangetoond dat resultaten uit de varkensexperimenten goed te extrapoleren zijn naar de mens. In de studies in dit projectvoorstel wordt bij muizen voornamelijk naar de effectiviteit van

de behandelmethoden gekeken. In het varkensmodel worden de resultaten behaald in het muizenmodel geverifieerd en wordt er daarnaast ook gekeken naar de optimale wijze van toediening.

Door ontwikkeling en uiteindelijk toepassing van de innovatieve behandelingen die hier beschreven worden kunnen patiënten sneller genezen en kunnen de pijnlijke verbandwissels verminderd worden. Dit zal de kwaliteit van leven voor de patiënt verbeteren en kan kostenreductie in de zorg opleveren.

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

In de literatuur is uitgebreid beschreven dat diabetische muizen een vertraagde wondgenezing hebben en dat Bleomycine behandeling leidt tot fibrose (littekenvorming) bij wondgenezing in muizen. Wij zullen deze modellen gebruiken om resp. chronische en fibrotische wondgenezing te vergelijken met acute wondgenezing in muizen. We maken dus eerst chronische resp fibrotische excisiewonden, om vervolgens deze effecten te verminderen met behulp van PRP-producten. De verwachting is dat een specifieke samenstelling van PRP per wondtype noodzakelijk zal zijn. Voor het stimuleren van chronische wondgenezing verwachten wij dus een andere samenstelling PRP te ontwikkelen dan voor het tegengaan van littekenvorming. Dit testen wij met behulp van de verschillende wondmodellen in de muis. De wetenschappelijke vraag is dus of PRP producten de genezing van acute en chronische wonden kan verbeteren en littekenvorming kan tegengaan. In het varken zullen wij testen of bacteriële contaminatie van acute wonden (excisie- en brandwonden) voorkomen kan worden met een nieuw type verbandgel, ██████ Tenslotte worden beide nieuwe technieken gecombineerd getest op excisie en/of brandwonden in het varken om de vraag te beantwoorden of bacteriële contaminatie voorkomen kan worden en genezing bevorderd kan worden door deze technieken te combineren en zo tot een nieuwe behandeling van (brand)wonden te komen.

Om de doelstelling te bereiken is de volgende volgorde van experimenten gepland:

#### Onderzoek PRP

Voor dit onderzoek zullen verschillende muizenmodellen gebruikt worden:

- Commercieel verkrijgbare diabetische muizen voor onderzoek naar chronische wonden.
- Bleomycine behandelde muizen voor fibrose (littekenvormend) model. De dieren worden gedurende 4 weken dagelijks (m.u.v. weekenden) geïnjecteerd (subcutaan) met bleomycine.
- Wild type muizen voor normale wondgenezing.

Bij deze dieren zullen op de flanken, onder narcose, gestandaardiseerd wonden aangebracht worden met behulp van een biopteur (4-8 mm). De wonden worden behandeld met verschillende PRP preparaten of placebo. Gedurende de eerste week zal deze behandeling, onder narcose, maximaal 4 keer herhaald worden tijdens geplande verbandwissels.

(voor verdere details zie bijlage 1)

1. Karakteriseren chronisch en fibrotisch (litteken-vormend) wondmodel in muis.

(zie flow schema figuur 1, stap 1.1); (vergelijking in normale muizen, diabetische muizen en bleomycine-behandelde muizen: snelheid van wondgenezing wordt gemeten, in monsters van de wonden worden fibrose-parameters gemeten (Uitleesparameters: oa collageen, alpha-smooth muscle actine expressie/depositie, littekenvorming, de weefselmonsters worden geoogst na opoffering van de dieren)

2. Vervolgens wordt het effect van verschillende samenstellingen/bestanddelen van PRP op de genezing van verschillende wondtypen bestudeerd in normale muizen, diabetische muizen en bleomycine-behandelde muizen: (stap 1.2) (Uitleesparameters: oa collageen, alpha-smooth muscle actine expressie/depositie, littekenvorming)
3. Op basis van de verkregen resultaten worden de meest optimale PRP samenstellingen per wondtype gekozen die vervolgens worden getest in excisie- en brandwonden modellen in het varken om het effect op de genezing te bestuderen en een adequaat formulering/verbandstelsel te kunnen testen. (stap 1.3) (Uitleesparameters: oa collageen, alpha-smooth muscle actine expressie/depositie, littekenvorming, bij varkens kan ook een weefselmonster van ca 3 mm in doorsnee worden uitgenomen onder narcose, waarna het dier in de proef blijft) (zie bijlage 2)

#### Onderzoek ██████████

Simultaan aan de bovenbeschreven stappen zal in verschillende wondmodellen in het varken ██████████ als verbandmiddel worden getest.

4. ██████████ wordt in eerste instantie in partiele excisie wonden toegepast om de invloed op de genezingsreactie te onderzoeken (stap 2.1). Deze experimenten worden met en zonder toevoeging van bacteriën uitgevoerd om de barrière functie te onderzoeken.
5. Vervolgens zal ██████████ getest worden in brandwonden (partiele diepte) in varkens waarop een brandwondenkorst aanwezig is om de invloed hiervan op de werking van ██████████ te kunnen evalueren. (stap 2.2)
6. In volledig diepe wonden wordt de toepassing van ██████████ met een huidtransplantaat getest. (stap 2.3)

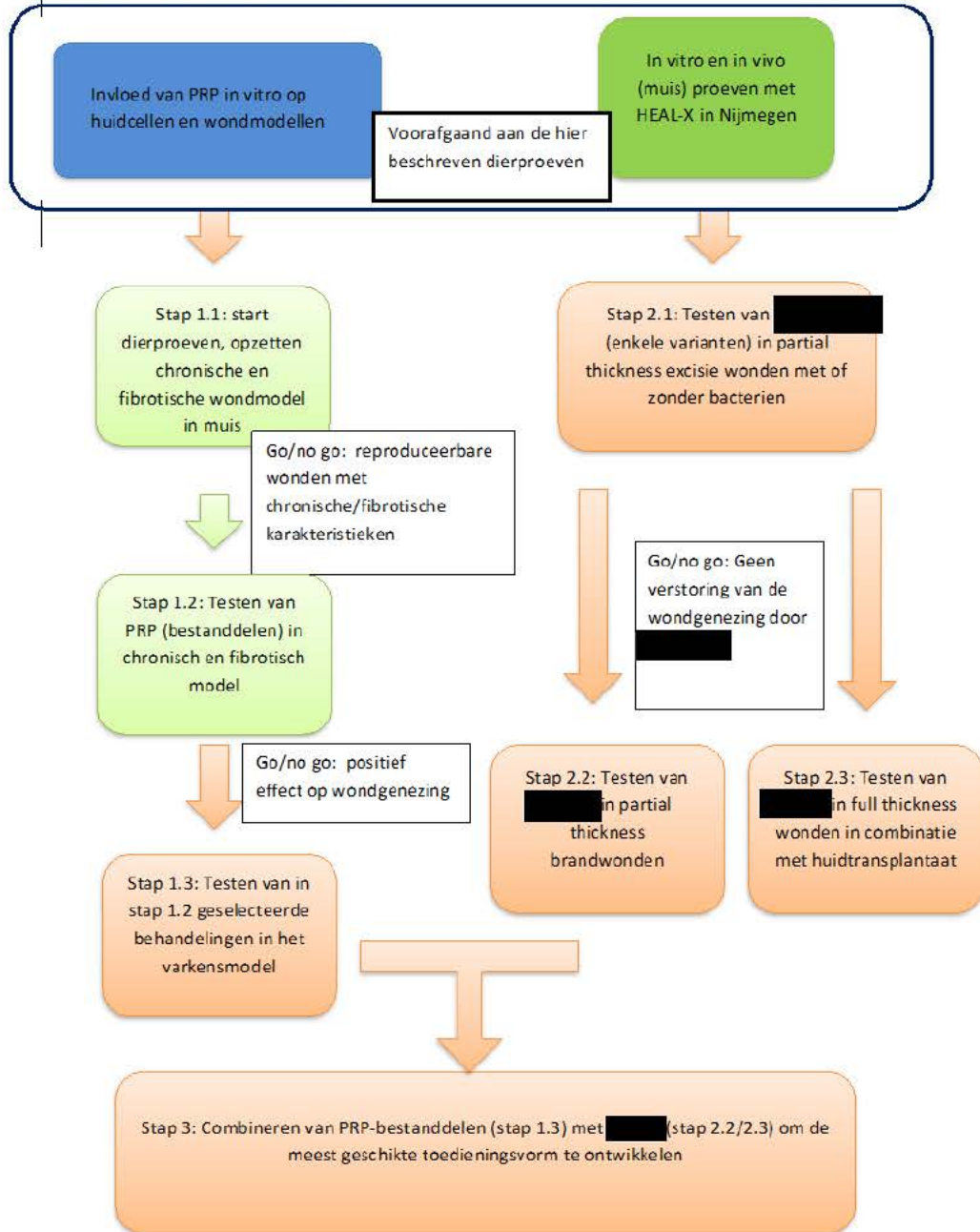
#### Combinatie PRP en ██████████

7. Op basis van de verkregen resultaten worden de meest optimale PRP (componenten) in combinatie met ██████████ en andere toedieningsmethoden getest in excisie- en brandwonden modellen in het varken om het effect op de genezing en een adequaat formulering/verbandstelsel te kunnen bestuderen. (stap 3)

Aan het einde van dit project willen we beschikken over voldoende bewijs voor veiligheid en effectiviteit om de stap naar humane toepassing te kunnen maken.

Innovatieve wondbehandelingen ter bevordering genezing van diverse typen wonden en het voorkomen van bacteriën in de wond

Blauw is in vitro, groen muis, oranje varken



Figuur 1: Flowdiagram.

We kiezen voor de muis vanwege de volgende argumenten:

- Er is een diabetische muis beschikbaar die het mogelijk maakt om ook chronische wonden te bestuderen.
- Met knaagdieren kunnen meerdere variabelen in relatief grote groepen getest worden.



- Veel eigenschappen van de muis zijn beschreven in literatuur.
- Formaat van het dier en de wond is respectievelijk klein en groot genoeg om te behandelen

Voor de vervolggexperimenten kiezen we voor het varken vanwege de volgende argumenten:

- De huid van het varken komt meer overeen met de huid van de mens.
- Het genezingsproces in het varken is vergelijkbaar met genezing bij de mens.
- De behandeling van varkenswonden sluit meer aan bij de klinische praktijk dan de behandeling van knaagdieren.
- Op het varken is het mogelijk verbandtechnieken te gebruiken die direct te vertalen zijn naar gebruik bij de mens
- Er zijn meerdere behandelingen per dier mogelijk

#### Onderzoek plaatjesrijk plasma:

Ad 1: (Stap 1.1 in flowdiagram) Allereerst zullen in de muis de modellen voor de verschillende soorten wonden worden opgezet en gekarakteriseerd aan verschillende wondgenezing parameters (snelheid van wondgenezing wordt gemeten, in monsters van de wonden worden fibrose-parameters gemeten (bijv collageen, alpha-smooth muscle actine). Vervolgens zullen deze modellen gebruikt worden om de verschillende samenstellingen van PRP te bestuderen op de genezing van deze wonden.

Chronische/acute wonden: voor chronische wondgenezing worden diabetische muizen aangeschaft. Hun behandeling is verder identiek aan die van de controle muizen: er worden wondjes gemaakt zoals beschreven in de bijlage, snelheid van genezing wordt gemeten met behulp van planimetrie op basis van foto's. Op verschillende tijdstippen wordt verband geïnspecteerd (dagelijks) en zo nodig gewisseld, eerste week dagelijks vervolgens 2 maal per week. Foto's worden tijdens de verbandwissels genomen (dier onder verdoving). Voor het oogsten van wondweefsel worden op verschillende tijdstippen (ongeveer dag 4, 7, 14, 21 en 28) dieren geëuthanaseerd.

Voor het bestuderen van fibrotische wondgenezing worden de dieren voor aanvang van de proef gedurende ca 4 weken blootgesteld aan (subcutane injectie) toediening van bleomycine zoals beschreven in de literatuur. De procedure van bestuderen van genezing is identiek aan die hierboven beschreven voor de chronische/acute wonden, met als toevoeging dat in deze wonden specifiek naar fibrotische markers (TGF beta, alpha-smooth muscle actine) gekeken zal worden in het geogste wondweefsel (na euthanasie).

#### Ad 2 (Stap 1.2 in flowdiagram) Plaatjesrijk plasma

Momenteel worden de verschillende componenten van PRP in celweek op huidcellen en in in vitro/ex vivo wondmodellen getest. Werkzame componenten zullen vervolgens in vivo getest worden in een excisie wondmodel in {diabetische} muizen voor chronisch wonden, gewone muizen voor acute wonden en bleomycine behandelde muizen als fibrotisch **acut** wondmodel. De beste formuleringen zullen vervolgens getest worden in varkens om de juiste toedieningsvorm in combinatie met verbandtechniek te kunnen onderzoeken.

Op de rug/flank van diabetische muizen zullen excisie wonden gemaakt worden, die met

verschillende PRP varianten behandeld zullen worden. Vervolgens wordt de wondgenezing gevolgd en vergeleken met die in normale muizen en muizen die vooraf behandeld zijn met middelen zoals bleomycine om een fibrotisch wondmodel te creëren. Tijd tot wondgenezing wordt gevolgd, maar ook wordt de ontstekingsreactie bestudeerd en wordt de kwaliteit van het wondweefsel gemeten met behulp van (immuun)histochemische parameters en/of RNA analyse. Ad 3 (Stap 1.3 in flowdiagram) Tenslotte worden de meest veelbelovende PRP varianten getest in het wondmodel in het varken. Hier wordt vervolgens de tijd tot genezing (re-epithelialisatie) en de kwaliteit van de genezing gemeten met (immuun)histochemische parameters en/of RNA.

### Onderzoek █████

Stimuleren van wondgenezing en voorkomen van bacteriële contaminatie █████ is een nieuw type wondgel, die zowel als hydrogel als in de vorm van een spray op de wond aangebracht kan worden. Door de unieke temperatureigenschappen (vloeibaar bij lage temperatuur (tussen 8-20°C) en gelvorm bij temperaturen vanaf 25 °C) is deze hydrogel bijzonder geschikt als wondverband. In eerste instantie wordt door middel van in vitro proeven vastgesteld of deze gel de viabiliteit en proliferatie van huidcellen beïnvloedt, en zo ja, in welke mate. Vervolgens wordt vastgesteld dat geen belangrijke inflammatoire reacties optreden bij toepassing van de componenten van de hydrogel bij muizen █████: Deze experimenten maken geen deel uit van deze projectaanvraag). Nadat voldoende duidelijkheid is verkregen met betrekking tot de stabiliteit van de gel, wijze van aanbrengen, cytotoxiciteit en biocompatibiliteit (het optreden van nadelige effecten op de cellen in de wond en huid en eventuele afstotingsreacties), is het noodzakelijk de gel in het varkensmodel te testen. Bij deze dieren zijn meerdere behandelingen per dier mogelijk. Er worden achtereenvolgens verschillende wondmodellen in het varken toegepast: partiële of volledige diepte, excisie of brandwonden en huidtransplantatie. De keuze van het toe te passen wondmodel hangt samen met de verschillende indicatiegebieden voor de verschillende varianten van █████. Deze wondmodellen geven een betere voorspelling voor het uiteindelijke gedrag van de wondgel en de bij de wondgenezing betrokken cellen in de mens dan de wondmodellen in andere dieren. Ook worden identieke verbandsystemen als bij de mens toegepast bij het varken; dit is in de cavia of muis technisch niet mogelijk. Achtereenvolgens zullen verschillende versies van █████ getest worden:

Ad 4: (Stappen 2.1 flowdiagram) als wond dressing in wondmodellen voor schaafwonden (model donorsites (de plaats waar de te transplanteren huid wordt afgeschaafd voor huidtransplantaties),

Ad 5: (Stappen 2.2 in flowdiagram) wonden van gedeeltelijke diepte (zoals bv heetwaterverbrandingen) en

Ad 6: (Stappen 2.3 in flowdiagram) volledige diepte (bv diepe brandwonden en chronische wonden na debridement (het verwijderen van dood weefsel uit de wond)). Bij deze wonden worden huidtransplantaten toegepast en speelt het voorkomen van bacteriële contaminatie een belangrijke rol.

Ad 7: (Stappen 3 in flowdiagram) Tenslotte zal █████ in combinatie met PRP-componenten in het varkensmodel toegepast worden.

---

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

### Onderzoek plaatjesrijk plasma:

### Stap 1.1 flowdiagram Muizen, type dierproef 1

Opzetten verschillende wondmodellen in muizen.

De in de literatuur beschreven modellen zullen in deze eerste stap worden opgezet.

In db/db muizen (diabetisch model) en muizen behandeld met bleomycine (fibrotisch model) worden onder narcose excisie wonden aangebracht van circa 8 mm in diameter (maximaal 4 per dier, minimaal 4 mm uit elkaar). Op verschillende tijdstippen, tussen 1 en 14 dagen na inductie van de wonden, worden de dieren gedood en worden de wondgebieden uitgesneden. De wondgenezing wordt beoordeeld op chronische dan wel fibrotische karakteristieken.

Uitkomstparameters worden gemeten d.m.v. macroscopische (wondmorfologie: diameter/wondsluiting) en microscopische ((immuno-)histochemische) technieken. De parameters zullen zijn: fibrose (myofibroblasten), contractie, epitheel (uitgroei), granulatieweefsel, bloedvatontwikkeling en ontsteking.

### Stap 1.2 flowdiagram Muizen

De werkzaamheid van plaatjesrijk plasma voor het stimuleren van genezing van chronische wonden zal getest worden in *db/db muizen*, die Diabetes type 2 ontwikkelen (Park 2014). Bekend is dat deze conditie leidt tot verstoorde wondgenezing. Dit zal vergeleken worden met identieke experimenten in *controle muizen (wild type)*, aangevuld met testen in muizen waarin een *fibrotisch fenotype* (Usategui 2014) is opgewekt. Excisie van wonden tot circa 8 mm in diameter (maximaal 4 per dier, minimaal 4 mm uit elkaar) zal plaats vinden onder narcose, waarna de wonden behandeld worden met verschillende PRP producten of placebo. Op verschillende tijdstippen, tussen 1 en 14 dagen na inductie van de wonden, wordt een deel van de dieren gedood en worden de wondgebieden uitgesneden. Uitkomstparameters worden gemeten d.m.v. macroscopische (wondmorfologie: diameter/wondsluiting) en microscopisch ((immuno-)histochemische technieken). De parameters zullen zijn: fibrose, contractie, epitheel en bloedvatontwikkeling en ontsteking.

### Stap 1.3 flowdiagram Varkens, type dierproef 2 (deel)

Na selectie van de best werkzame samenstelling en/of componenten van de PRP producten/bestanddelen in het muismodel zullen aanvullende proeven gedaan worden in het wondmodel in het varken. De wondgenezing in het varken is beter vergelijkbaar met die in de mens, door structuur en opbouw van de huid. Hiervoor zullen zowel wonden van partiële diepte als volledige diepte (met transplantatie) gebruikt worden. Deze wonden worden aangebracht door met een dermatoom (electrisch mes dat op breedte en diepte instelbaar is) huid af te schaven. Per dier zullen maximaal 14 excisiewonden worden aangebracht van 3x3 cm of maximaal 10 brandwonden van 4x4 cm, de grootte en aantal van de wonden is gebaseerd op eerder onderzoek met deze proefdieren. De individuele dieren zullen of excisiewonden of brandwonden krijgen. Behalve partiele en volledig diepte excisiewonden zullen ook brandwonden van partiele diepte behandeld worden om het effect op de verhoogde ontstekingsreactie beter te kunnen volgen. De brandwonden worden aangebracht met behulp van een verhit koperen blok van 4x4 cm. Maximaal zullen 10 brandwonden per dier worden aangebracht. Per dier kunnen verschillende behandelingen getest worden, waardoor een betere onderlinge vergelijking van de werkzaamheid van de verschillende componenten mogelijk wordt. Naast effecten van de behandeling op de genezing zal in het varken ook de meest optimale toedieningsvorm en verbandtechniek onderzocht worden. (Zie ook volgende onderdeel.)

## Onderzoek [REDACTED]

De [REDACTED] wonddressings worden eerder getest in in vitro proeven en in muizen ([REDACTED]). Echter, in deze dieren is het niet mogelijk een volledig wond dressing systeem te ontwikkelen dat bij de mens gebruikt kan worden, aangezien knaagdieren dat niet/slecht toelaten. Ook huidtransplantaties, een belangrijk indicatiegebied voor het gebruik van [REDACTED] dressings, zijn bij knaagdieren matig uitvoerbaar. In het varken kan dit wel getest worden en er is ruime ervaring met het aanbrengen van dergelijk wond dressing systemen uit eerdere studies.

### Stap 2.1 Flowdiagram, type dierproef 2 (resterend deel)

Allereerst zal [REDACTED] getest worden in een wondmodel in het varken dat overeenkomt met wonden van gedeeltelijke diepte, zoals de donorsites voor huidtransplantaten of schaafwonden. Deze wonden worden aangebracht door met een dermatoom (electrisch mes dat op breedte en diepte instelbaar is) huid af te schaven (3 x 3 cm). In deze wonden kan goed getest worden welk secundair verband het meest geschikt is om over de hydrogel aan te brengen. Tevens wordt in dit model gekeken naar de genezingscondities (wordt bv een vochtig wondmilieu gecreëerd door [REDACTED]) en wordt genezingsstijd gemeten. Na succesvol doorlopen van deze tests zullen voorbereidingen beginnen voor het klinisch testen van [REDACTED] bij dit type wonden.

### Stap 2.2 Flowdiagram Vervolgens zal in het varkensmodel voor partiële diepte brandwonden bestudeerd worden of en op welke wijze [REDACTED] in staat is te functioneren als membraanverband.

De behandeling met [REDACTED] zal vergeleken worden met de gouden standaard voor dit type brandwondbehandeling, nl hydrofiber verband (Aquacel) of donorhuid (geglyceroliseerde cadaverhuid [REDACTED]). Deze wonden zullen worden aangebracht als contactverbranding met een verhit koperen blok (4 x 4 cm). Een belangrijk verschil met de gedeeltelijk-diepe excisiewonden is dat in deze wonden sprake is van necrotisch weefsel. Daardoor zullen we kunnen bestuderen of [REDACTED] ook in deze omstandigheden in staat is de wond goed af te blijven sluiten voor bacteriële contaminatie. Eventueel kan provocatie met bacteriën plaats vinden.

Stap 2.3 Flowdiagram Tenslotte zal [REDACTED] getest worden in het varkensmodel als wond dressing over excisiewonden van volledige diepte, die vervolgens behandeld zijn met een huidtransplantaat. Excisie vindt plaats met behulp van het dermatoom, zo nodig aangevuld met excisie met het mes tot volledige diepte van de huid. Deze wonden zijn tot 3 x 3 cm in oppervlak. Hierbij zullen we kunnen beoordelen of [REDACTED] ook onder deze moeilijker omstandigheden (meer wond exsudaat bijv.) stabiel blijft, en hoe lang de integriteit van het wondverband en daarmee het beschermende milieu gehandhaafd blijft en wat het effect op het huidtransplantaat is (bv graft take en uitgroei).

Stap 3 Flowdiagram: De geselecteerde PRP-producten (stap 1.3) zullen gecombineerd worden met de geselecteerde [REDACTED] preparaten (stap 2.2/2.3) om de meest geschikte toedieningsvorm te ontwikkelen.

---

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

Zie tevens figuur 1. Flowdiagram

Om effecten van verschillende samenstellingen van PRP dan wel de componenten van PRP (PRP formuleringen) op de genezing van verschillende wondtypen te kunnen bestuderen worden er verschillende muismodellen opgezet.

Keuzemoment: Indien de wonden niet reproduceerbaar zijn of niet aan de karakteristieken voor de verschillende wondtypen voldoen volgt er uiteraard een beslismoment. Aangezien deze verschillende modellen uitgebreid in de literatuur beschreven zijn en onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft m.b.t. in vivo wondmodellen verwachten we hier niet veel problemen.

Mijlpaal: Reproduceerbare wondmodellen voor verschillende wondtypen

Vervolgens zullen in de verschillende modellen verschillende PRP formuleringen getest worden om de optimale formulering per wondtype te bepalen.

Keuzemoment: Indien geen enkele formulering een gunstig effect heeft op de genezing van een wondtype zal het onderzoek voor dat wondtype gestaakt worden.

Mijlpaal: Per wondtype de meest optimale PRP formulering ter bevordering van het genezingsproces

██████ zal in het varken partiele diepte excisie model getest worden op functionaliteit als wondbedekker.

Keuzemoment: Indien ██████ de genezing nadelig zou beïnvloeden wordt de gel op dat aspect aangepast

Mijlpaal: Een nieuw type wondbedekker dat de vochtbalans in de wond goed reguleert en de wond beschermt tegen micro-organismen.

Het effect van ██████ als wondbedekker of tijdelijk transplantaat op brandwond en

A) een partieel diepe brandwond met een necrotische korst.

B) een volledig diepe wond die behandeld wordt met een huidtransplantaat, eventueel als tijdelijk transplantaat.

Keuzemoment: Indien zou blijken dat ██████ kan de brandwond niet kan afsluiten, de genezing van de brandwond cq de overleving van het transplantaat verstoord worden, wordt de gel op deze aspecten aangepast voordat de volgende fase van ontwikkeling gestart wordt.

Mijlpaal: een goed afsluitende wondbedekker die een aantal dagen zijn werking doet en eventueel als tijdelijk transplantaat kan dienen en het definitieve huidtransplantaat niet negatief beïnvloed.

Ontwikkelen van juiste toedieningsvorm en verbandmethode voor het aanbrengen van PRP formuleringen en ██████

Mijlpalen: Vaststellen van de meest optimale toedieningsvorm en verbandmethode voor het aanbrengen PRP formuleringen en ██████ op wonden.

Onderdeel	Jaar 1	Jaar 2	Jaar 3	Jaar 4	Jaar 5
a) PRP	Genezing	Genezing	Genezing wonden en transplantaten		Genezing wonden en transplantaten
b) ██████			Genezing wonden en transplantaten	Genezing wonden en transplantaten	Genezing wonden en transplantaten

Muis (1.1 en 1.2) Type dierproef 1

Varken(1.3, 2.1, 2.2, 2.3 en 3) Type dierproef 2

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

Volgnummer	Type dierproef
1	1. Behandeling van chronische en acute wonden en fibrotisch acute in muizen met plaatjes-rijk-plasma (PRP) producten
2	2. Behandeling van wonden in varkens met PRP producten en/of ██████████
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11400
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Vrije Universiteit Medisch Centrum Amsterdam
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Behandeling van chronische en acute wonden en fibrose in muizen met plaatjes-rijk-plasma (PRP) producten |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Plaatjes-rijk-plasma (PRP) wordt steeds vaker gebruikt bij de behandeling van acute en chronische wonden. PRP wordt verkregen uit bloed door middel van centrifugatie. Hierbij worden de bloedcellen, hoofdzakelijk bloedplaatjes, gescheiden van het bloedplasma. Door verschil in de gebruikte technieken ontstaan verschillen in de samenstelling (formulering) van het eindproduct, bv doordat bepaalde celtypen (o.a. witte bloedcellen) wel of juist niet verwijderd worden. Ook kan dit product per patiënt verschillen bv omdat de onderliggende aandoening van de patiënt een effect heeft op de samenstelling of activiteit van de bloedplaatjes. Daardoor verschilt de effectiviteit van deze producten vaak. Daarom willen we een, qua samenstelling, gestandaardiseerd product ontwikkelen. Om het effect van verschillende PRP formuleringen op de genezing van verschillende wondtypen te kunnen bestuderen kiezen we voor de muis als diermodel. Er zijn diabetische muizen commercieel verkrijgbaar waarin een genezing van chronische wonden bestudeerd kan worden. Door het wild type van deze muizenstam te gebruiken kunnen we de effecten van verschillende PRP formuleringen ook in een "normaal" genezingsmodel bestuderen. Tot slot kunnen we in het zelfde wild type muis een fibrotisch model induceren door bleomycine toe te dienen. Bleomycine is een chemische stof die in verschillende organen fibrose kan opwekken, het wordt in de literatuur vaak gebruikt om fibrotische processen te kunnen bestuderen. Bovendien kunnen in deze muizenmodellen relatief veel verschillende formuleringen getest worden. In het eerste experiment worden de 3 verschillende wondmodellen gekarakteriseerd. In dit experiment zullen de specifieke wond karakteristieken van de wondtypen bestudeerd worden, zoals de duur van de genezing, re-epithelialisatie en fibrose. Dit wordt gedaan door de wond macroscopisch te beoordelen of met behulp van



microscopische technieken waarbij het weefsel voor specifieke fibrotische kenmerken aangekleurd kan worden (immuno-histochemie).

Vervolgens zullen verschillende formuleringen van PRP getest worden in de afzonderlijke wondmodellen. Primaire uitkomstmaten zijn de snelheid van re-epithelialisatie en tijd tot wondsluiting. Door het nemen van weefselmonsters (biopten) zullen ook de angiogenese (ingroei van nieuwe bloedvaten) (CD31) epitheel vorming (pan-keratine, VEGF) en fibrose (alpha Smooth Muscle Actine) bestudeerd worden.

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

Om fibrose te induceren bij de wild type (WT) muis, wordt 4 weken voorafgaand aan de proef (dag -28) gestart met het dagelijks (m.u.v. weekend) intradermaal injecteren van bleomycine op de rug van WT muis, deze fibrose muis zal worden aangeduid als WTfibrose muis (WTfibr). Op dag 0 wordt bij alle groepen muizen (diabetische db/db, fibrose wild type (WTfibr) en de controle groep wild type (WT) één of enkele wonden gemaakt met een biopteur (doorsnede van 4-8 mm), dit wordt mede gebaseerd op beschrijvingen uit de literatuur. Perioperatief wordt adequate pijnstilling toegediend en het maken van de wonden gebeurt onder adequate anesthesie. De grootte van de wonden wordt gefotografeerd en vervolgens worden de wonden verbonden. Op dag 1 worden, onder passende anesthesie, de wonden behandeld met een PRP formulering, de verbanden zo nodig verschoond en de wond wordt geëvalueerd. Deze behandeling met PRP formulering zal maximaal 4x herhaald worden tot maximaal dag 7. Daarna worden de wonden op verschillende tijdstippen geëvalueerd tot maximaal dag 28 (2X/week). Tevens zullen er op vooraf bepaalde vaste tijdstippen een aantal dieren worden geofferd door middel van CO2 inhalatie, om vervolgens de wonden uit te snijden voor histologie. Afhankelijk van de vraagstelling zullen op verschillende tijdstippen dieren geofferd worden: tijdstip ca. dag 4 en 7 voor wondgenezing; ca. dag 14 en 28 voor evaluatie littekenvorming.

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

Het aantal varianten van PRP dat getest gaat worden (en daarmee het aantal benodigde dieren), wordt beperkt door in vitro screening vooraf. Voor aanvang van de dierexperimenten zullen diverse aspecten van PRP producten getest zijn in in vitro celkweek en ex vivo huid proeven. Er wordt getest op effecten op migratie en proliferatie van fibroblasten en keratinocyten in celkweek en in het ex vivo brandwondmodel. Tevens wordt van de PRP varianten de groeifactorconcentratie, cytokinen samenstelling en concentratie en plaatjesfuncties bepaald. Tevens worden dezelfde effecten van opgezuiverde relevante groeifactoren (zoals PDGF) in in vitro experimenten bepaald. Hierdoor is het mogelijk voor aanvang van de dierexperimenten de varianten van PRP te selecteren die de beste eigenschappen hebben om in vivo wondgenezing te stimuleren.

## **B. De dieren**

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

Soort: Muis; De dieren worden bij een erkende leverancier aangeschaft (Diabetische muizen (db/db): BKS(D)-Leprdb/JOrIRj en wild type muizen C57BLKS/J)

Als model voor chronische wondgenezing is eigenlijk alleen de db/db muis goed gedefinieerd. Daarom is gekozen voor deze diersoort, aangezien de uiteindelijke toepassing bedoeld is voor zowel acute als voor chronische wonden. Om goed de vergelijking te kunnen maken tussen chronische, fibrotische en acute wondgenezing zullen we de db/db mutant en wild type muizen gebruiken. Wild type muizen zullen behandeld worden met bleomycine om de fibrotische wondgenezing te bestuderen en de niet bleomycine behandelde wild type muizen dienen als controle voor acute wonden.

Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren van ongeveer dezelfde leeftijd zullen gebruikt worden.

Een voorlopige berekening is te maken met effect op wondgenezing als uitkomstmaat: een (minimaal) verschil in wondgenezing van 10% met een veronderstelde SD van 8 à 9 geeft een effect size van 1.1 tot 1.25 en een  $n=10$  à  $n=12$  bij een power van 0.8 en  $\alpha=0.05$  (Gpower versie 3.1.9.2). Indien we rekening houden met uitval van  $< 10\%$  is een maximale groepsgrootte van  $n=12$  nodig.

Totaal: 648 muizen maximaal.

Er zal een pilot gedaan worden om te testen hoeveel wondjes per dier behandeld kunnen worden en hoe groot deze dienen te zijn. Dit zal met diabetische, fibrotische en controle muizen gedaan worden. Ook zal getest worden hoe lang deze wondjes erover doen om te genezen zodat de tijdspunten van verzamelen van wondmateriaal vervolgens goed gekozen kunnen worden. Hiervoor zijn maximaal 3 keer 12 muizen nodig =36 muizen, waarvan 12 db/db muizen.

Er wordt rekening gehouden met het testen van in totaal max 14 verschillende PRP formuleringen.

Er worden echter verschillende producten getest voor acute dan wel chronische wondgenezing. Daarom is het aantal controle dieren hoger, aangezien die in beide proefopzetten van belang zijn.

Muizen (WT): maximaal 15 behandelingen (inclusief controle groep) x 12 dieren/groep x 2 tijdspunten = 360 muizen +24 voor de pilot = 384

Bleomycine behandelde muis: maximaal 7 behandelingen (inclusief controle groep) x 12 dieren/groep x 1 tijdspunt (14 dagen, eindpunt fibrose) = 84

Db/db muizen: maximaal 7 behandelingen (inclusief controle groep) x 12 dieren/groep x 2 tijdspunten = 168 +12 voor de pilot = 180

Bron: erkende leverancier

Leeftijd/gewicht: Diabetische muizen zijn gemiddeld ca 16 weken oud. De leeftijd van controle en fibrotische muizen zal overeenkomstig gekozen worden.

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Vervanging

Tijdens de in vitro testen wordt al bepaald welke producten getest zullen worden in een diermodel.

Wondgenezing is echter een complex proces, zeker bij chronische wonden, dat niet geheel in alle facetten in vitro onderzocht kan worden. Zo zijn er bijvoorbeeld geen ontstekingscellen aanwezig. Daarom moet de werking van deze producten in een diermodel onderzocht worden.

Vermindering

Door meerdere wonden op één dier aan te brengen kan het aantal dieren teruggebracht worden. Dit zal in een eerste proefopzet getest worden, bij het opzetten van het model. Daaruit moet duidelijk worden of er meerdere kleinere wonden per dier aangebracht kunnen worden (maximaal 2 per dier) zodat de experimenten met minder dieren uitgevoerd kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar de volgende aspecten: kunnen de wonden fysiek van elkaar onderscheiden worden tbv behandeling en evaluatie (er moet enige afstand tussen de wondjes zijn om te voorkomen dat de ene behandeling in de andere doorloopt); is er geen systemische component aanwezig in de te testen behandeling; en wordt het wondoppervlak per dier niet te groot. Hierbij baseren we ons (mede) op literatuur en ervaring.

### Verfijning

Er wordt gebruikt gemaakt van humane eindpunten, adequate pijn stilling, anesthesie door getraind personeel. Hierdoor zal uitval van dieren zoveel mogelijk worden voorkomen.

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

Vooraf en na afloop van de handelingen wordt adequate pijnstilling (zie onder H) toegediend, alle handelingen die pijn kunnen veroorzaken vinden plaats onder algehele narcose. Om er zeker van te zijn dat het verband intact blijft, is het noodzakelijk om alle dieren solitair te huisvesten vanaf de eerste ingreep tot het einde van de proef. Dieren kunnen anders bij elkaar het verband of de wond(-korst) stukmaken.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

PRP producten zijn in de literatuur beschreven. De producten zijn echter zeer variabel en niet gekarakteriseerd. Wij zullen juist gekarakteriseerde en goed gedefinieerde producten gaan testen. Deze zijn in de literatuur niet beschreven en zullen een belangrijke bijdrage leveren voor verbetering van wondgenezing van complexe wonden in de praktijk.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De dieren worden solitair gehuisvest. Dit is noodzakelijk omdat de dieren anders aan elkaars wonden en verbanden zouden kunnen knagen.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voorafgaand aan de ingreep wordt een passende pijnstilling toegediend, deze wordt na 8 uur en indien nodig herhaald. Op basis van eerder opgedane ervaring en literatuur is dit de meest optimale methode.

Inschatting van pijn bij muizen:

-Gewicht: de dieren worden dagelijks gewogen in de eerste periode (week 1) na de ingreep. Als dieren afvallen, of op gewicht blijven (terwijl ze volgens de algemene groeicurve horen te groeien) dan kan dat een teken zijn dat ze zich niet goed voelen.

-Vacht en verzorging: het niet/slecht verzorgen van de vacht, vieze oogjes/neus, omhoog staan van de vacht zijn allemaal tekenen dat ze zich niet goed voelen.

-Gedrag: ze horen actief en nieuwsgierig te zijn. Als ze zich niet goed voelen kan dat zich uiten in bijv: sloomheid, weinig reactie op aanraking, of juist extreme reactie (schrikken, stress) hierop.

-Ademhaling: er wordt gelet op zichtbare afwijkingen aan de ademhaling, bv moeizame of heel snelle ademhaling.

Pijnstilling: Adequate pijnstilling wordt gegeven voordat de dieren onder narcose gebracht worden.

Pijnbestrijding vindt plaats op de dag van het aanbrengen van de wonden en indien nodig bij verbandwissel.

Herhaling van anesthesie vindt plaats bij verbandwissels en wondinspectie

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitaire huisvesting.

Beperktere bewegingsvrijheid door verband

Diabetes (alleen bij db/db muizen)

Dagelijkse injectie bleomycine (alleen bij WTfibr muizen)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Voorkomen van risico op aanvreten verbandmiddelen en wonden.

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

Er is kooiverrijking en drinkwater en voedsel zijn vrij verkrijgbaar.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Indien er sprake is van apatisch (eet)gedrag, verminderde drinkwaterinname (gewichtsverlies van meer dan 20%) of een wondinfectie die de wondgenezing ernstig verstoort.

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

Wij hebben zelf nog weinig ervaring met deze dieren, maar afgaande op de literatuur en consultatie van collega onderzoekers verwachten we < 10% uitval.

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Cumulatief is er sprake van het volgende ongerief:

Solitaire huisvesting: licht ongerief (100% van de dieren)

Diabetes ontwikkeling (db/db) muizen: licht ongerief (1/3 van de groep)

Bleomycine injecties (dagelijks): matig (1/3 van de groep)

Injecties tbv pijnbestrijding: licht ongerief (100% van de dieren)

Aanbrengen wonden onder anesthesie: matig ongerief (100% van de dieren)

Herhaalde anesthesie tbv behandeling en verbandwissel (max. 10 handelingen): matig ongerief (100% van de dieren)

Doden d.m.v. CO2: terminaal

Cumulatief: Matig ongerief voor 100% van de dieren in de proef.

soort ongerief	kwalificatie	% van de dieren
Solitaire huisvesting	Licht ongerief	100%
Diabetes ontwikkeling	Licht ongerief	33%
Bleomycine injecties	Matig ongerief	33%
Injecties pijnbestrijding	Licht ongerief	100%
Aanbrengen van de wonden onder anesthesie	Matig ongerief	100%
Herhaalde anesthesie tbv verbandwissels (max. 10 handelingen)	Matig ongerief	100%
Doden onder anesthesie	Terminaal	100%
Cumulatief	Matig	100%

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Bij einde experiment worden de (gezezen) wonden uitgesneden voor nadere histologische en immunohistochemische analyse.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11400
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Vrije Universiteit Medisch Centrum Amsterdam
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 2          | Behandeling van wonden in varkens met PRP producten en [REDACTED] |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om de translatie naar humane toepassing beter te kunnen maken worden er experimenten op varkens uitgevoerd. De structuur van de huid komt meer overeen met de humane huid dan van knaagdieren, bovendien verloopt het genezingsproces in het varken vergelijkbaar met de genezing van wonden bij de mens. Bij deze experimenten wordt het effect van PRP formuleringen en [REDACTED] op de wondgenezing bestudeerd. Tevens wordt onderzocht welke formulering cq toedieningswijze/verband techniek het best gebruikt zou kunnen worden. Het doel is een toedieningswijze/verbandstelsel te ontwikkelen voor de PRP en [REDACTED] eventueel in combinatie met andere middelen die ook klinisch toepasbaar is. Doordat er op de flanken van het varken meerdere type wonden gemaakt kunnen worden (partiële diepte of volledige diepte, excisie- of brandwonden) kunnen er verschillende behandelingen (mits systemische effecten uitgesloten kunnen worden) op één dier getest worden. De interindividuele variatie wordt hiermee gereduceerd, waardoor bv intra-individuele statistische testen uitgevoerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren behandeld hoeven te worden.

Als primaire uitkomstmaat wordt gekeken naar uitkomst van wondgenezing (effectiviteit), de tijd tot re-epithelialisatie van de wond (wondgenezing) en mate van littekenvorming. Dit zal zowel macroscopische beoordeeld worden (contractie, roodheid en littekenvorming) als histologisch (ontsteking en dermale regeneratie).

Afhankelijk van de uitkomsten van de experimenten bij de muizen (zie bijlage 1) zullen een klein aantal maximaal 4 verschillende formuleringen worden toegepast in varkens.

Het effect van de PRP formuleringen en █████ zijn al uitvoering in in vitro modellen onderzocht. Omdat een immuunreactie in vitro ontbreekt, is het noodzakelijk dit in vivo te testen. In muizen zal de genezingscapaciteit door PRP formuleringen in verschillen wondtypen onderzocht worden (zie bijlage 1). Aangezien belangrijke aspecten van de wondgenezing in muizen minder goed vergelijkbaar zijn met die in de mens, is het van belang het effect op de wondgenezing (dit kan alleen op acute en fibrotische wonden) en de optimale wijze van toediening en verbandtechniek in het varken te bestuderen. Het varken is hier, op basis van eerdere experimenten, een geschikt proefdier voor. Voor █████ zullen ten eerste partieel diepe excisiewonden toegepast worden, en vervolgens zullen brandwonden getest worden om ook de rol van de brandwondenkorst (eschar) te kunnen bestuderen. In theorie zou de brandwondenkorst de effectiviteit van █████ kunnen verminderen. In diepe excisie wonden welke klinisch altijd behandeld zullen worden met een huidtransplantaat zal vervolgens het effect van █████ op overleving van het transplantaat getest worden. Het effect van █████ op de wondgenezing wordt bepaald op verschillende tijdstippen. Om de effecten van PRP formuleringen te testen in diepe excisiewonden met huidtransplantaten wordt als primaire uitkomstmaten de tijd tot re-epithelialisatie gemeten. Door het nemen van biopten zullen ook de angiogenese (CD31) epitheel vorming (pan-keratine, VEGF) en fibrose (alpha Smooth Muscle Actine) bestudeerd worden.

---

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

Voorafgaand aan de behandeling wordt adequate pijnstilling toegediend. Op de flanken van Yorkshire varkens worden onder adequate anesthesie de experimentele gebieden getatoeëerd. De tatoeage dient om gedurende het experiment wondgenezing te kunnen onderscheiden van contractie, en om te kunnen corrigeren voor de (aanzienlijke) groei van het dier. Het mechanisme van wondgenezing (uitgroei van epitheel) in het varken lijkt sterk op dat in de mens, en is afwijkend van dat in knaagdieren (genezing door wondcontractie). Juist daarom is deze parameter belangrijk om te kunnen kwantificeren. Om te voorkomen dat de tatoeage inkt in de open wonden terecht komt worden een week later per flank maximaal 7 excisie wonden gemaakt (3 x 3 cm), deze procedure vindt plaats onder algehele anesthesie. De wonden worden op gestandaardiseerde wijze aangebracht. Dit kunnen excisiewonden zijn van partiële of volledige diepte van de huid. Bij de dieren waarbij brandwonden worden aangebracht wordt de tatoeage uitgevoerd op de dag van het aanbrengen van de wonden. Dit kan wel op de dag van de ingreep omdat er hier geen open wonden zijn en er dus geen risico op inkt in de wonden komt en de dieren toch al onder algehele narcose gebracht worden. De brandwonden worden op gestandaardiseerde wijze aangebracht en kunnen ook van partiële of volledige diepte zijn. Bij volledige diepe brandwonden wordt het necrotisch weefsel na 14 dagen geëxcideerd en getransplanteerd met een split skin graft conform de klinische praktijk. De behandeling met PRP start na transplantatie. Behandeling met █████ start direct na het aanbrengen van de brandwond.

Voor het testen van producten die de wondgenezing stimuleren worden de verschillende producten na aanbrengen van de wonden aangebracht, de eerste applicatie kan direct gedurende dezelfde procedure zijn of tot ongeveer 24 h later. De behandeling kan herhaald worden tot de wond gesloten is. De frequentie van toediening wordt bepaald in eerdere (muizen) experimenten.

█████ wordt opnieuw aangebracht indien het de wond niet volledig afsluit. Dit wordt gebaseerd op visuele waarnemingen.

Op verschillende tijdstippen (tijdens de behandelingen rond dagen 1, 2, 4, 7 en 14 en tijdens follow up na ongeveer 21, 28 en 56 dagen) worden de wonden beoordeeld en worden er foto's, biopten en/of bloed afgenomen. Aan het einde van het experiment (rond dag 56) worden de dieren geofferd en wordt de volledige wond uitgesneden. Indien de proefopzet daarom vraagt kunnen evt. latere tijdpunten opgenomen worden (tot max 6 maanden).

---

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



Voorafgaand aan de dierproeven is door middel van in vitro proeven reeds bepaald welke concentraties en bestanddelen nodig zijn voor de behandeling van PRP. Daardoor hoeven geen dieren gebruikt te worden voor het uittesten van werkzame doses. Het uiteindelijke effect in vivo dient echter wel in dieren getest te worden, aangezien in vitro niet de invloed van een actief immuunsysteem en bloedcirculatie getest kan worden. Met behulp van deze resultaten zal het uiteindelijke aantal te behandelen wonden en dieren bepaald worden.

Aangezien het nieuwe producten betreft hebben we nu nog geen gegevens om sample size berekeningen heel precies uit te kunnen voeren. We verwachten voor het testen van verschillende PRP formuleringen maximaal 15 varkens nodig te hebben.

Voor het testen van ████████ denken we 6 varkens nodig te hebben voor het testen van verschillende composities van ████████ op verschillende typen wonden.

Voor de combinatie van PRP en ████████ denken we nog eens 6 varkens nodig te hebben.

---

## **B. De dieren**

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

Er wordt voor varkens gekozen omdat de huid en wondgenezing van varkens grote overeenkomsten vertoont met die van de mens. Ook de wijze van verbinden van wonden is voor het beoordelen van de producten die wij willen testen van groot belang. In het varken kunnen wij de wonden verbinden op identieke wijze als bij de mens. Dit is in bv knaagdieren technisch niet mogelijk.

Soort: Yorkshire varkens

Leeftijd/gewicht: 6-12 weken. Voor deze leeftijd wordt gekozen vanwege het te verwachten hogere gewicht van oudere dieren, waardoor het moeilijk wordt deze nog goed te hanteren en verbinden.

Afhankelijk van huisvestingsmogelijkheden en in overleg met het proefdierinstituut zal gekozen worden voor vrouwelijke of een mix van vrouwelijke en mannelijke dieren.

De voorkeur gaat uit naar vrouwelijke dieren vanwege praktische aspecten (de penis zit onder het verband en geeft problemen bij het plassen). Daarnaast ontstaat er geen overschot van één geslacht omdat mannelijke dieren verkocht worden aan fok bedrijven of KI stations, of geslacht worden voor consumptie.

Herkomst categorie: erkende leverancier

Geschatte aantal: (totaal voor het hele project) 27

De behandelingen moeten op minimaal 3 dieren worden uitgevoerd vanwege individuele verschillen tussen de varkens. Per dier worden max 14 excisiewonden (7 op elke flank) of 12 brandwonden (6 per flank) aangebracht.

1.3: PRP: maximaal 15 varkens

We testen 4 PRP formuleringen en een controle behandeling. Per dier worden op 6 partiële diepte en 6 volledige diepte (brand) wonden verdeeld over twee flanken behandeld. De volledig diepe brandwonden worden na 2 weken geëxcideerd conform de klinische praktijk. Omdat er zich systemische effecten kunnen voordoen van de groeifactoren die in de PRP-preparaten voorkomen, wordt elk dier met maar 1 formulering behandeld. Met 3 dieren per formulering brengt dat dat het aantal dieren op 15.

████████ maximaal 12 varkens

2.1 Partiële diepte wonden excisie voor ontwerp verbandsysteem met en zonder bacterieload: testen van elk 3 varianten per dier met en zonder bacteriën (elke variant minimaal in duplo), elk in 3 dieren= 3 varkens

2.2 en 2.3 Partiële diepte, en volledig diepte brandwonden, excisie en transplantatie, voor effect wondgenezing:

Per dier worden op 6 partiële diepte en 6 volledige diepte (brand) wonden verdeeld over twee flanken aangebracht.

---

Voor de brandwonden gaan we uit van 6 wonden per flank, er zijn dan 3 variabelen (in duplo) per flank te testen. In totaal zijn hiervoor 3 dieren nodig.

3. Testen aanpassingen ██████ in combinatie met 2 varianten PRP en een standaard behandeling als controle: 2 series van elk 3 dieren. 3 dieren per variant PRP, = 6 varkens.

Er is gekozen voor meerdere wonden per dier waardoor het aantal dieren aanzienlijk verminderd kon worden. Het aanbrengen van meerdere wonden per dier zal het ongerief waarschijnlijk iets doen toenemen per dier maar niet recht evenredig met het aantal wonden. Door het aantal dieren te verhogen en het aantal wonden per dier te verminderen zou voor een groter aantal dieren leed betekenen.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### Vervanging

De gekozen behandelmethoden zijn in vitro al onderzocht. Omdat een immuunreactie in vitro ontbreekt, is het noodzakelijk dit ook in vivo te testen. Een aantal aspecten zal in muizen worden onderzocht zoals samenstelling en dosering bij verschillende wondtypen (zie bijlage 1). Deze resultaten zullen in het varken bevestigd worden in het fibrotische wondtype omdat in het varken een chronisch wondmodel niet mogelijk is. ██████ is een compleet nieuwe verbandstelsel, deze wonddressings worden eerder getest in in vitro proeven en in muizen (██████). In het varken kan een volledig wonddressings systeem ontwikkeld worden (inclusief genezings bevorderende en antibacteriële componenten) dat bij de mens gebruikt kan worden. Het is noodzakelijk dit in het varken uit te testen, aangezien knaagdieren verbandmiddelen zoals die in de kliniek gebruikt worden niet/slecht toelaten. Er is ruime ervaring met het aanbrengen van dergelijke wonddressings systemen uit eerdere studies.

#### Vermindering

Door meerdere (maximaal 14) wonden per dier aan te brengen, kunnen er verschillende behandelingen en wonddressings per dier worden getest. Het aanbrengen van meerdere wonden per dier levert dat ieder dier ook zijn eigen controle is, er zijn dus geen aparte controle groepen nodig. In het verleden hebben we ruime ervaring opgedaan met dit aantal wonden per varken.

Meerdere parameters worden in hetzelfde varken gemeten. Door het aanbrengen van meerdere wonden per varken kan het aantal dieren verminderd worden. Hoewel het ongerief per varken waarschijnlijk iets toeneemt zal het totale ongerief bij meerdere wonden per dier niet evenredig toenemen met het aantal wonden.

### Verfijning

Er wordt gebruikt gemaakt van humane eindpunten (zie J), adequate pijn stilling, anesthesie door getraind personeel. Hierdoor zal uitval van dieren zoveel mogelijk worden voorkomen.

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

Voorafgaand aan de behandeling zal adequate pijnstilling worden toegepast, deze wordt na de ingreep en zolang nodig herhaald. Alle handelingen die pijn kunnen veroorzaken vinden plaats onder algehele narcose. De dieren worden naast elkaar (maar solitair) gehuisvest, er is kooiverrijking en evt. achtergrondmuziek in de stal. Drinkwater is vrij beschikbaar.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Deze studies betreffen recent ontwikkelde nieuwe producten dan wel prototypes. Op grond van beschikbare literatuur en communicatie met mensen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van deze producten is vastgesteld dat de nu voorgestelde studies niet eerder zijn uitgevoerd.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De varkens worden solitair gehuisvest, de dieren worden naast elkaar gehuisvest, ze kunnen elkaar wel ruiken en er is kooiverrijking. Er is geen direct contact met soortgenoten, dit is noodzakelijk omdat de dieren anders aan elkaars wonden en verbanden zouden kunnen knagen.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voorafgaand aan de ingreep wordt een passende pijnstilling i.m. toegediend, gedurende de ingreep die onder volledige narcose plaats vindt wordt dit herhaald, na afloop en gedurende 14 dagen volgend op de ingreep wordt pijnstilling (op de meest geschikte wijze, bv via een pleister) toegepast. Alle handelingen die pijn kunnen veroorzaken vinden plaats onder algehele narcose.

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren worden vanaf de eerste ingreep in het experiment solitair gehuisvest, maar wel naast elkaar, zolang er verband noodzakelijk is.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Geen direct contact met soortgenoten, noodzakelijk ivm risico op aanvreten van verbandmiddelen en wonden.

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

De dieren worden naast elkaar gehuisvest, zodat minimaal contact tussen de dieren mogelijk is. Drinkwater en voedsel zijn vrij verkrijgbaar. Er is kooiverrijking en evt. achtergrondmuziek in de stal.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Voor het bepalen van pijn wordt er gelet op hoe de dieren reageren: alert, geïnteresseerd en nieuwsgierig, of stil, apathisch of humeurig. Daarnaast worden veranderingen in voedsel opname en loop patroon gebruikt als indicaties voor pijn.

Het experiment wordt voortijdig beëindigd indien het dier slecht eet of apatisch gedrag vertoont, of algemene verschijnselen van ziekte. In eerste instantie zal dan getracht worden de oorzaak te bestrijden bv door het geven van extra pijnstilling en/of andere medicijnen indien de opzet van het experiment dit toelaat. Dit wordt beoordeeld door de onderzoeker, de proefdierdeskundige en/of dierenarts.

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

Op basis van onze ervaring verwachten we geen uitval van dieren.

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Cumulatief is er sprake van het volgende ongerief:

Solitair huisvesting: licht ongerief (100% van de dieren)

Injecties tbv pijnbestrijding: licht ongerief (100% van de dieren)

Aanbrengen wonden onder adequate anesthesie (intubatie) en pijnbestrijding: matig ongerief (100% van de dieren)

Herhaalde anesthesie (tot 7x) tbv behandeling, nemen van biopten, bloedafname en verbandwissel: matig ongerief (100% van de dieren)

Doden onder anesthesie: terminaal

Cumulatief: Matig ongerief voor 100% van de dieren in de proef.

soort ongerief	kwalificatie	% van de dieren
Solitaire huisvesting	Licht ongerief	100%
Injecties pijnbestrijding	Licht ongerief	100%
Aanbrengen van de wonden onder anesthesie	Matig ongerief	100%
Herhaalde anesthesie tbv verbandwissels	Matig ongerief	100%
Doden onder anesthesie	Terminaal	100%
Cumulatief	Matig	100%

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Aan het einde van het experiment worden de wonden volledig uitgesneden voor verder onderzoek. Omdat we van elke wond een deel van de gezonde huid en een groot deel van het litteken histologisch willen onderzoeken zouden er grote en diepe wonden ontstaan met risico op infecties en complicaties.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

T.a.v. [REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED] AMSTERDAM

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002017853

**Bijlagen**

2

Datum 1 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 februari 2017. Het gaat om uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002017853. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

1 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853



**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400  
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 64156338  
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Onderzoeker in opleiding  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

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 april 2017  
Geplande einddatum: 1 april 2022  
Titel project: Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden  
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapieën voor verbeterde wondgenezing  
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Datum:**

1 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.287,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 1 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002017853

**Bijlagen**

2

Datum 1 februari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 februari 2017

Vervaldatum: 3 maart 2017

Factuurnummer: 170853

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002017853	€ 1.287,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002017853

Datum 20 februari 2017  
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 1 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" met aanvraagnummer AVD114002017853. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Onduidelijkheden**

De CCD is van mening dat het ongerief voor het toebrengen van de brandwonden in de varkensstudie als ernstig ingeschat zou moeten worden. U heeft het ongerief als matig ingeschat. Kunt u dat beargumenteren?

In de aanvraag staat dat tijdens de uitvoering van het project bekeken zal worden of pijnbestrijding strijdig is met het behalen van de doelstelling. Wij vragen u om als onderdeel van de aanvraag te beargumenteren of de doelstelling het wel of niet toelaat. Indien niet strijdig met doelstelling dan wil de CCD als voorwaarde aan de vergunning toevoegen dat ook aan continue pijnbestrijding wordt gedaan. Indien u het daar niet mee eens bent kunt u daarop reageren.

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

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

**Datum:**

20 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

**Wanneer een beslissing**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



## Melding bijlagen

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

### 1 Uw Gegevens

Naam instelling: Vrije Universiteit Medisch Centrum

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD114002017853

### 2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

**Datum:**

20 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

**3 Ondertekening**

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:  
Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 24 februari 2017 13:43  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD114002017853

Geachte [REDACTED]  
Ik heb het antwoord ontvangen en het is nu geheel duidelijk. Wij gaan ook mee met de argumentatie.  
Ik zal de beschikking opmaken. De vergunning komt dan in de eerste helft van volgende week naar u toe.

Met vriendelijke groet,

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

.....  
Gelieve email over projectaanvragen te richten aan: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 23 februari 2017 10:38  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD114002017853

Geachte CCD,

Naar aanleiding van uw onderstaande mail hebben we deze vraag binnen de DEC en IvD besproken, hierbij hebben we ook de betrokken onderzoekers en biotechnici geraadpleegd.

Ons antwoord hebben we vandaag via de beveiligde NetFTP verbinding naar u opgestuurd. Onder: AVD\_11400 met de naam: Antwoord CCD Brandwonden Varken\_final\_AVD114002017853.pdf.

We hopen hiermee de vraag van de CCD voldoende te hebben beantwoord, wanneer er aanvullende informatie nodig is horen we dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
[REDACTED]  
Secretaris DEC en IvD VU-VUmc  
Arbo & Milieu



[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
BEZOEKADRES: [REDACTED] Amsterdam | [Disclaimer](#)

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** maandag 20 februari 2017 11:40

To: [REDACTED]

Subject: FW: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD114002017853

Geachte DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum,

Op 01-02-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden' met aanvraagnummer AVD114002017853.

De CCD is van mening dat het ongerief voor het toebrengen van de brandwonden in de varkensstudie als ernstig ingeschat zou moeten worden. U bent met de inschatting van het ongerief als matig akkoord gegaan. Kunt u dat beargumenteren? De CCD heeft richting de aanvrager gevraagd om, als onderdeel van de aanvraag, te beargumenteren of adequate pijnbestrijding strijdig is met de doelstellingen, en indien dit niet het geval is, pijnbestrijding toe te passen.

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

## Antwoord DEC en IvD VU/VUmc bij projectvoorstel AVD114002017853

Geachte ██████████

Beneden treft u de antwoorden op de CCD vragen aan, die met alle betrokkenen bij het toetsen van CCD voorstel AVD114002017853 zijn uitgewerkt. Bij de inschatting van het ongerief en de details van uitvoer zijn zowel de onderzoekers, de IvD als de DEC betrokken.

De CCD is van mening dat het ongerief voor het toebrengen van de brandwonden in de varkensstudie als ernstig ingeschat zou moeten worden. Wij zijn met de inschatting van het ongerief als matig akkoord gegaan. De redenen hiervoor zijn de volgende:

1. Aangezien 'full-thickness' wonden worden aangebracht (excisie, contact verbranding dan wel heet water verbranding) zijn de zenuwuiteinden verwijderd (excisie) of vernietigd (verbranding) waardoor er geen gevoel (pijn) meer is in de wond. Aan de wondranden zal wel pijn worden ervaren, maar dat is met name bij mobiliteit van de wondrand. Aangezien ze stevige verbanden dragen is dit minimaal.

2. De CCD heeft richting de aanvrager gevraagd om, als onderdeel van de aanvraag, te beargumenteren of adequate pijnbestrijding strijdig is met de doelstellingen, en indien dit niet het geval is, pijnbestrijding toe te passen.

Pijnbestrijding is zeker niet strijdig met de doelstelling en wordt nauwkeurig toegepast: Voor het aanbrengen van de brandwonden, beginnen we met oraal NSAID (meloxicam) en een Fentanyl pleister op het oor. De NSAID wordt gedurende twee tot drie weken 1 x daags vervolgd, en de Fentanyl pleister kan elke drie dagen vervangen worden zolang als nodig. Pijnbestrijding gebeurt oraal en transdermaal, en dit is naar onze mening een duidelijke verbetering in vergelijking met vroegere methodes zoals dagelijks inspuiten. De varkens vallen gedurende het experiment niet af, zijn tam, speels en reageren niet op aanraking van de wonden. De dieren groeien goed, zijn niet bang, zijn aanhankelijk en vertonen, na het wennen aan de individuele huisvesting, natuurlijk gedrag.

3. Bij een onderzoek met dezelfde methodiek bij varkens die al door de CCD in 2016 is goedgekeurd (AVD114002016601) was destijds de inschatting van het ongerief ook 'matig' en wij zien geen reden waarom dit in het nieuwe CCD voorstel anders zou moeten zijn.

4. Volgens de EU richtlijn 2010/63/EU, die de CCD zelf hanteert (zie pagina 76-79 voor indeling classificatie), vallen deze handelingen onder de categorie 'matig'.

Concluderend is onze inschatting dus matig.

Met vriendelijke groet,

Namens de DEC voorzitter (VU/VUmc/UvA), de IvD voorzitter en IvD dierenarts (VU/VUmc), de betrokken onderzoekers en de biotechnici betrokken bij de uitvoer van het project.

# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:  
*NVWA nummer 11400*
2. Titel van het project:  
*Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden*
3. Titel van de NTS:  
*Nieuwe therapieën voor verbeterde wondgenezing*
4. Type aanvraag:  
*Nieuwe aanvraag projectvergunning*
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
  - telefoonnummer contactpersoon: 0[REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: *24-11-2016*
  - aanvraag compleet: *24-11-2016*
  - in vergadering besproken: *13-12-2016 en 10-01-2017*
  - anderszins behandeld: *n.v.t.*
  - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
  - aanpassing aanvraag: *21-12-2016 en 12-01-2017*
  - advies aan CCD: *01-02-2017*
7. Afstemming IvD
  - Datum advies IvD: *24-11-2016*
  - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

### Vraagronde 1

- Datum: *14-12-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Er is een duidelijkere translatie nodig tussen de gebruikte diermodellen en de praktijk van wondgenezing in patiënten. Graag de typen wonden per stap benoemen. De plaatjes-rijk plasma producten, hoe wordt dit precies toegediend? Wees consequent met de aantallen, dit komt nu niet altijd overeen tussen het voorstel en de bijlagen dierproeven. Noem in de bijlagen duidelijk het scenario per dier, welke handelingen ondergaat een individueel dier precies?*
- Datum antwoord: *21-12-2016*

- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven. De aanvraag zal besproken worden tijdens de plenaire vergadering van 10 jan.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

#### Vraagronde 2

- Datum: *11-01-2017*
- Strekking gestelde vragen: *Enkele tekstuele opmerkingen. Daarnaast ziet de DEC graag een tabel waarin men de typen wonden opsplijt.*
- Datum antwoord: *12-01-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. n.v.t*

## **C. Beoordeling (inhoud)**

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

*Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. *Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie translationeel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

### **Belangen en waarden**

4. *Het directe doel van deze studie is nieuwe strategieën/behandelmethodes te ontwikkelen voor de verbetering van wondgenezing van verschillende typen wonden in diermodellen (zowel acute als chronische wonden). Daarnaast wordt de meest geschikte toedieningsvorm en wijze van verbinden getest.*

*Het uiteindelijke doel is deze nieuwe strategieën/behandelmethodes toe te passen in de kliniek voor verbetering van wondgenezing bij patiënten. Wondgenezing is een complex proces waarbij vaak complicaties optreden, wat kan resulteren in ernstige littekens of wonden die niet genezen. Door ontwikkeling en uiteindelijk toepassing van de innovatieve behandelingen die hier beschreven worden, kunnen patiënten sneller genezen en kunnen pijnlijke verbandwissels verminderd worden. Dit zal de kwaliteit van leven voor de patiënt verbeteren en kan kostenreductie in de zorg opleveren.*

*Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

*De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op de ontwikkeling van strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing, zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.*

*De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Nieuwe effectievere behandelmethodes voor verbeterde wondgenezing.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *n.v.t.*

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

*Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er samengewerkt met de andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. Deze inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van nieuwe effectievere behandelmethodes voor verbeterde wondgenezing. De*

*gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de gezien de logische opbouw van het onderzoek.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwefdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.*

10. *De dieren worden over het algemeen gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Echter om er zeker van te zijn dat het verband intact blijft, is het noodzakelijk om alle dieren solitair te huisvesten vanaf de eerste ingreep tot het einde van de proef. De dieren kunnen anders bij elkaar het verband of de wond(-korst) stukmaken. Kooiverrijking wordt toegepast om de negatieve effecten van solitaire huisvesting tegen te gaan.*

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

*Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.*

*Alle dieren, varkens en muizen, zullen maximaal matig ongerief ervaren. De dieren ondervinden licht ongerief als gevolg van solitaire huisvesting, injecties voor pijnbestrijding en doden onder anesthesie. Sommige muizen zullen ook diabetes ontwikkelen (diabetes muismodel; model voor chronische wonden) wat zorgt voor licht ongerief. Matig ongerief wordt bij alle dieren verwacht als gevolg van aanbrengen van wonden onder anesthesie en herhaalde anesthesie t.b.v. verbandwissels. Daarnaast zullen bij de muizen de bleomycine injecties (fibrotisch muismodel; model voor acute wonden) zorgen voor matig ongerief.*

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan, bij de dieren zullen gedefinieerde wonden worden aangebracht. De dieren krijgen dezelfde pijnbestrijding als patiënten met wonden, maar desondanks kunnen ze toch pijn en jeuk ondervinden. Bovendien kunnen de dieren ongerief ondervinden door injecties, solitaire huisvesting en als gevolg van diabetes of fibrose.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht, gedrag of algehele malaise. Men zal de humane eindpunten toepassen indien er sprake is van apatisch (eet)gedrag, verminderde drinkwaterinname, gewichtsverlies van meer dan 20% of een wondinfectie die de wondgenezing ernstig verstoort. Men verwacht deze humane eindpunten bij maximaal 10% van de muizen toe te passen. Op basis van ervaring verwachten de onderzoekers geen uitval bij de varkens.*

**3V's**

14. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdier vrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*Men maakt zoveel mogelijk gebruik van proefdier vrije alternatieven en tijdens de in vitro testen wordt bepaald welke producten getest zullen worden in een diermodel. Wondgenezing is echter een complex proces, waarvan niet alle facetten in vitro onderzocht kunnen worden. Zo zijn er in vitro bijvoorbeeld geen ontstekingscellen aanwezig en kan er geen verbandtechniek worden getest. Daarom moet de werking van deze producten in een diermodel onderzocht worden.*

*De keuze voor het gebruik van muizen en varkens is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Men kiest voor het gebruik van muizenmodellen, omdat daarin bepaalde ziektebeelden zoals diabetes en littekenvorming opgewekt kunnen worden. De dieren met diabetes vertonen net als bij de mens een vertraagde wondgenezing, waardoor de effecten van de verschillende producten bij chronische wondgenezing kunnen worden onderzocht. In de vervolggexperimenten kiest men voor het varken, omdat de behandeling van varkenswonden meer aansluit bij de klinische praktijk dan de behandeling van knaagdieren. De anatomie van de huid en het proces van wondgenezing van het varken komt grotendeels overeen met die van de mens, daardoor is het mogelijk verbandtechnieken te gebruiken die direct te vertalen zijn naar gebruik bij de mens.*

15. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

*Voordat de dierexperimenten worden uitgevoerd zijn de behandelingen uitvoerig in laboratoriummodellen getest, alleen de kansrijkste behandelingen worden vervolgens in dieren onderzocht. Waar mogelijk zal men meerdere wonden op één dier aanbrengen, waardoor minder dieren gebruikt worden en waarbij het lijden per dier nauwelijks toeneemt. Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt.*

*Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 648 muizen en 27 varkens en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

16. *Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.*

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zullen de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Verder zullen de dieren dagelijks beoordeeld worden en indien het dier het humaan eindpunt bereikt zal het uit de proef worden genomen. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.*

17. *Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over*



voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: *n.v.t.*

### **Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef**

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

*Voor de muizen geldt dat zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt. Voor de varkens zal gekozen worden voor vrouwelijke dieren of een mix van vrouwelijke en mannelijke dieren, afhankelijk van de huisvestingsmogelijkheden en in overleg met het proefdierinstituut en de IvD. Daarbij gaat de voorkeur uit naar vrouwelijke dieren vanwege praktische aspecten, bij mannetjes zit de penis onder het verband en dit geeft problemen bij het plassen. Daarbij zal geen overschot ontstaan van één geslacht, omdat mannelijke dieren verkocht worden aan fokbedrijven of KI stations, of geslacht worden voor consumptie.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

*De dieren worden gedood om hun weefsel, en de wonden, verder te kunnen analyseren.*

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

*Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.*

### **NTS**

21. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

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

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:*

*Rechtvaardigt de ontwikkeling van nieuwe strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing het gebruik van maximaal 648 muizen en 27 varkens in de dierproef die daarvan maximaal matig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren.*

*De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel omdat de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing.*

*De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 648 muizen en 27 varkens die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor de ontwikkeling van nieuwe behandelmethodes om wondgenezing te verbeteren is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een effectievere behandelmethode voor wondgenezing is afgewogen tegen het, als maximaal matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 648 muizen en 27 varkens en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Het maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandelmethode voor wondgenezing. Het wetenschappelijk belang is reëel, de kennis over wondgenezing zal worden vergroot.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk belang en het reële wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 648 muizen en 27 varkens en en het daarbij verwachte maximaal matige ongerief.*

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

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

*Er is geen dilemma geconstateerd.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD114002017853  
**Bijlagen**  
1

Datum 27 februari 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 1 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" met aanvraagnummer AVD114002017853. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

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

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

U kunt met uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2017 tot en met 31 maart 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de maximale vergunningstermijn 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 1 februari 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.

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

**Datum:**  
27 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

### **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.

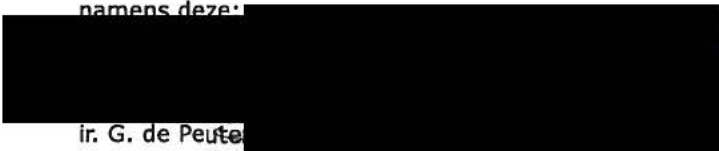
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
ir. G. de Peute  
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum  
Adres: de Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2017 tot en met 31 maart 2022, voor het project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" met aanvraagnummer AVD114002017853, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 februari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 februari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 februari 2017, ontvangen op 3 februari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>1: Behandeling van chronische en acute wonden en fibrose in muizen met plaatjes-rijk-plasma (PRP) producten</b>				
	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Diabetische muizen (db/db): BKS(D)- Leprdb/JOrlRj en wild type muizen C57BLKS/J)	648	100% Matig	
<b>2: Behandeling van wonden in varkens met PRP producten en Heal-X</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) / commercieel verkregen	27	100% Matig	

### Voorwaarden

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

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

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

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



**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

## 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:**

AVD114002017853

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.