

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-098

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 20-09-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
22-09-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³
nvt

LNV/CBDNR ⁴
nvt

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	3098.1139n
--------------	------------

Titel van het onderzoek:

Onderzoek naar in vivo biocompatibiliteit van

startdatum 1-8-2011

einddatum 9 1-8-2015

Duur van de proef¹⁰:

1 mnd

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art.9	
5.				Art.9/12 ⁸ Anders ⁶ :	

Diergroep	1	2					
ctrl/exp/sham	exp	exp					
Diersoort	02	02					
Stam	Wistar	Wistar					
Construct / mutatie ?	Nee	Nee					
Herkomst (leverancier) *	01	01					
Aantal	48	96					
Geslacht	M/V	M/V					
Dieren immuuncompetent ?	ja	Ja	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	250gr	250gr					
Doel van de proef *	37	37					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	04	04					
Mate ongerief *	04	04					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHL-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Onderzoek naar in vivo biocompatibiliteit van

1. Doel van de proef.

Een littekenbreuk of hernia cicatricalis is een veel voorkomende complicatie na mediane laparotomie, de incidentie is ongeveer 15 %.^{1,2} In veel gevallen berust de behandeling op de implantatie van een "mesh" structuur. Dit is een kunststof "matje" dat het mogelijk maakt om de breuk te sluiten. Het synthetische biomateriaal waaruit de "mesh" of "mesh graft" is gemaakt is veelal polypropreen. Dit is een stabiel en inert materiaal dat absoluut geen interactie met de omringende weefsels vertoont. Dit is dan ook de oorzaak van een betrekkelijk grote failure-rate. De mesh-gerelateerde complicaties hebben geleid tot de ontwikkeling van nieuwe mesh-structuren en vervanging van het polypropreen door meer biocompatibele materialen.³

In het kader van een recent toegekend), waarin wij samenwerken met RWTH Aachen, Uni Liege, Uni Hasselt en de Fachhochschule Aachen, werken wij aan de ontwikkeling van nieuwe meshes. Wij kiezen hier voor een plantaardig biomateriaal: de Door van het MUMC+ en van Klinikum Aachen wordt onze benadering als bijzonder interessant en kansrijk gekenschetst.

Derhalve willen wij een korte pilotstudie doen naar de effecten van in een rattenmodel, om zodoende een eerste indicatie te krijgen over biocompatibiliteit van de na implantatie. Hiervoor willen we enkele meshes van subcutaan inbrengen in een rat-model waarna we zullen inventariseren hoe de weefsels in de directe omgeving van de vezels reageren op het materiaal. Follow-up: 7 en 30 dagen.

(DEEL 1) In vivo studie naar het gebruik van binnen de chirurgie na 7 en 30 dagen en daarmee ernstige negatieve weefselreacties op het materiaal uitsluiten.

Vervolgens willen wij de effecten van intraperitoneale plaatsing van bekijken. In voorgaande studies hebben wij gezien dat intraperitoneale plaatsing van met name synthetische meshes weer andere complicaties met zich meebrengt dan subcutane plaatsing, onder andere in de vorm van adhesies.^{3,4} Follow-up: 7 en 30 dagen

(DEEL 2) in vivo studie naar intraperitoneale plaatsing van na 7 en 30 dagen en daarmee ernstige negatieve weefselreacties op het materiaal uitsluiten.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Een littekenbreuk of hernia cicatricalis is een onderhuids defect in de buikspieren en komt voor bij ongeveer 11 tot 20% van alle abdominale littekens.^{1,2} Bij ongeveer 6-15% van deze patiënten kan deze hernia cicatricalis resulteren in inklemming of afklemming van een stuk darm. Ook kan een herniatie leiden tot pijnklachten en beperkingen in het dagelijks leven.² In 2002 onderging daarom in Nederland 4% van de 100.000 patiënten met een laparotomie uiteindelijk een heroperatie voor het herstel van een littekenbreuk.⁵ Het gebruik van een chirurgische mesh intraperitoneaal is daarbij de beste methode voor het sluiten van littekenbreuken.^{1,2,5}

Op dit moment worden deze meshes voornamelijk gemaakt van kunststoffen zoals polypropreen. In vergelijking met een primair herstel met alleen hechtingen laten deze kunststof meshes een significante reductie in het aantal recidieven zien. Deze kunststof meshes worden echter ook gekenmerkt door een relatief hoog complicatierisico. Dit betreft dan voornamelijk een verhoogd risico op infectie van de mesh en adhesie van onder andere darm aan de mesh.^{3,5} De laatste jaren

zijn er om deze reden als alternatief de resorberende meshes (vicryl) en de biologische meshes (o.a. varkenshuid) ontwikkeld. Deze meshes zijn duur en het gebruik van deze meshes geeft een hoger risico op een recidief van de littekenbreuk.³ Het blijft dus noodzaak om te zoeken naar alternatieven voor deze reeds bestaande mesh grafts.

In de literatuur is op dit moment nog niets bekend over het gebruik van binnen de chirurgie. Echter gezien de eigenschappen van dit materiaal zien wij als onderzoeksgroep en de van het MUMC+ en het Klinikum Aachen zeer veel potentie in dit materiaal.

is niet immunogeen, volstrekt niet cytotoxisch, niet afbreekbaar door het menselijk lichaam, zeer hydrofiel en daarbij ook nog duurzaam en tegen relatief lage kosten te produceren.^{6,7} Vanwege deze eigenschappen zien wij vlas als een grondstof voor een nieuwe type mesh, welke als aanvulling op en eventueel zelfs als alternatief voor de reeds bestaande meshes kan dienen. Gezien de hoge en nog steeds toenemende incidentie van herniae cicatricialis is dit onderzoek van groot maatschappelijk en wetenschappelijk belang voor een grote en nog steeds toenemende groep patiënten.

3. Alternatieven

De reactie van levend weefsel op een vreemd materiaal is een dynamisch proces waarbij tal van cellen, inflammatoire reacties en mechanische factoren betrokken zijn. Het voorspellen van de reactie op het materiaal aan de hand van in vitro onderzoek is dan ook niet mogelijk. Proefdieren daarentegen verschaffen wel dit dynamische proces in vivo. Aangezien dit materiaal nog in geen enkele manier gebruikt wordt binnen de moderne geneeskunde, is het niet mogelijk om dit onderzoek op patiënten uit te voeren. Bovendien is het in patiënten niet mogelijk de adhesievorming betrouwbaar te meten, aangezien de buik bij patiënten niet opnieuw geopend of de meshes (of delen ervan) verwijderd kunnen worden, hetgeen immers tot een recidief littekenbreuk zou leiden.

4. Ethische afweging

Zoals bij maatschappelijke relevantie al is aangegeven is het mogelijke voordeel van deze proef de eerste stap te zetten naar het ontwikkelen van een nieuw type mesh. Dit zou grote voordelen kunnen hebben ten opzichte van de reeds gebruikte mesh grafts. Vanwege de eigenschappen van het materiaal biedt het een kans op een mesh die niet degradeert in het lichaam en hierdoor langdurig zijn trekkracht behoudt. Aangezien het in tegenstelling tot de reeds gebruikte kunststof meshes zeer makkelijk vloeistoffen opneemt (denk aan antibiotica), bestaat de mogelijkheid om deze meshes in geïnfecteerde gebieden te gebruiken. Als we daarnaast kijken naar de productiekosten van hebben we, zeker in vergelijking met de biologische meshes, een zeer kosten-effectief materiaal in handen.

Indien dit materiaal in vivo goed verdragen wordt, biedt het in de toekomst dus veel potentie binnen de herniachirurgie. Het gezondheidsvoordeel valt dan ook als groot te beschouwen.

Voor de proefdieren betekent deze proef dat in *deel 1* een tweetal meshes gemaakt uit eenmalig subcutaan in de flank van het dier geplaatst worden. Bij *deel 2* wordt eenmalig één mesh, gemaakt uit intraperitoneaal geplaatst. De mate van ongerief is voor deze dieren hierdoor, in combinatie met pijnstilling, als matig/ernstig te beschouwen. Na de operatie, in het begin van het experiment, zijn er geen verdere ingrepen meer. Op het einde van het experiment direct na euthanasie wordt macroscopische weefselreactie (infectie, ontsteking) en bij intraperitoneale plaatsing adhesievorming gescoord en wordt weefsel voor histologie afgenomen. Tijdens het experiment blijven dieren voor zover mogelijk in groep en in standaard huisvesting, met aangepaste kooiverrijking en bedding. Humane eindpunten worden gerespecteerd.

Wij zijn van mening dat we op deze manier zoveel mogelijk recht doen aan de intrinsieke waarde van de proefdieren en het ongerief zo veel als mogelijk beperken. Concluderend vinden wij dan ook dat het voordeel uit deze proef opweegt tegen de mate van ongerief voor de proefdieren.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Zie ook "1. Doel van proef" en "2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang".

Een littekenbreuk of hernia cicatricalis is een onderhuids defect in de buikspieren en komt voor bij ongeveer 11 tot 20% van de abdominale littekens.^{1,2} Bij ongeveer 6-15% van de patiënten kan zo een breuk resulteren in inklemming of afklemming van de darm. Ook kan een hernatie leiden tot veel pijnklachten en beperkingen in het dagelijks leven.² In 2002 onderging daarom in Nederland 4% van de 100.000 patiënten met een laparotomie uiteindelijk een heroperatie voor het herstel van een hernia cicatricalis.⁵ Het gebruik van een chirurgische mesh intraperitoneaal is daarbij de beste methode voor het sluiten van littekenbreuken.^{1,2,5}

Momenteel worden deze meshes voornamelijk gemaakt van kunststoffen zoals polypropreen. Zoals reeds genoemd leidt het gebruik van deze kunststofmatjes tot een verhoogd risico op complicaties, zoals infecties van de mesh en adhesie van darm aan de mesh.^{3,8} Vanwege onder andere deze reden zijn de laatste jaren een groot aantal alternatieven voor de standaard kunststof mesh ontwikkeld.³ De belangrijkste voorbeelden hiervan zijn: het ontwikkelen van diverse coatings voor de kunststof meshes (anti-adhesieve coatings), zelf resorberende meshes (vicryl) en de ontwikkeling van de biologische meshes (o.a. varkenshuid). Echter ook aan deze meshes kleven een groot aantal nadelen, van de zelf resorberende meshes is bekend dat er een zeer grote kans is op een recidief wanneer de mesh resorbeert. Over de biologische meshes is nog onvoldoende literatuur bekend om te kunnen concluderen dat deze een beter klinisch resultaat opleveren in vergelijking met de klassieke polypropreen meshes. Wat echter wel bekend is over de biological mesh graft is dat het in de fase waarin het collageen in de mesh vervangen wordt door lichaamseigen collageen tijdelijk zijn trekkracht verliest en daarmee een hoger risico op recidieven geeft. Daarnaast is het vooralsnog een zeer duur materiaal.³

Over het gebruik van binnen de herniachirurgie is tot op heden geen literatuur bekend. Het materiaal zelf wordt al zeer lange tijd gebruikt binnen de textielindustrie (linnen) en over de materiaaleigenschappen is veel literatuur bekend. Gezien deze eigenschappen en de resultaten van ons eigen in vitro onderzoek zien wij als en de van het MUMC+ en het Klinikum Aachen zeer veel potentie in dit materiaal als grondstof voor chirurgische meshes. De eigenschappen waarop wij hierboven doelen betreffen de afwezigheid van cytotoxiciteit bij ons eigen in-vitro onderzoek en het grote waterabsorberende vermogen van Deze laatste eigenschap sterke eigenschap van cellulose is dat het in vivo niet afgebroken wordt in tegenstelling tot de resorberende en biologische meshes.⁹ Ten slotte is het een duurzaam en relatief goedkoop te produceren materiaal.

Met dit onderzoek willen wij de in vivo biocompatibiliteit van evalueren en "adverse events" uitsluiten. Aangezien in het verleden bij onderzoeken met de synthetische meshes is gebleken dat "pore size" en de diameter van de vezel een belangrijke factor zijn in het ontwikkelen en voorkomen van negatieve reacties op meshes willen wij dit in ons onderzoek ook evalueren. Ook de aan- en afwezigheid van een antimicrobiële coating is van invloed op de incorporatie van het materiaal in het omringende weefsel.¹⁰ Derhalve hebben wij 5 verschillende vlas mesh grafts ontwikkeld:

- 1 mesh met een grote vezeldiameter en grote "pore size"
- 1 mesh met een grote vezeldiameter en kleine "pore size"
- 1 mesh met een kleine vezeldiameter en kleine "pore size"
- 1 mesh met een kleine vezeldiameter en kleine "pore size"
- 1 mesh met een antimicrobiële coating

Deze meshes zijn ontwikkeld in samenwerking met fabrikanten van reeds bestaande meshes en bedrijven welke zich reeds bezighouden met het weven en verwerken van De ontwerpen van onze meshes zijn dan ook gebaseerd op de reeds bestaande en uitgebreid onderzochte kunststof meshes. Daarnaast hebben wij reeds onderzoek gedaan naar de mogelijkheden van steriliseren en

bewerken van de meshes zonder verlies van kwaliteit. Op deze manier kunnen wij dus de kwaliteit en standaardisatie waarborgen.

DEEL 1: Het eerste deel van ons onderzoek zal zich met name richten op het evalueren van de in vivo biocompatibiliteit van in een rattenmodel. Derhalve zijn we van plan om bovengenoemde meshes plus een controlemesh (polypropreen) subcutaan te implanteren om vervolgens de macroscopische en histologische weefselreactie te evalueren. Aangezien er nog geen enkele literatuur bekend is over het gebruik van binnen de chirurgie is dit deel van het onderzoek nodig om ernstige negatieve reacties uit te sluiten. Aangezien er wel diverse onderzoeken zijn met het vergelijkbare bacteriële cellulose verwachten wij hier niet veel ernstige reacties te vinden. Zoals hierboven reeds genoemd zullen we de ratten verdelen in 5 experimentele groepen en 1 controlegroep. De meshes worden subcutaan geplaatst en de weefselreactie zal op twee tijdstippen geëvalueerd worden, namelijk na 7 dagen en na 30 dagen.⁹ Om het aantal dieren zoveel mogelijk te beperken zullen we per rat 2 mesh grafts plaatsen. Deze meshes zullen subcutaan in de flank geplaatst worden (in elke flank 1) met een afstand van >2cm van de incisie. Histologisch zal een ervaren proefdierpathologe die onbekend is met de achtergrond de reactie op de meshes scoren op items zoals necrose, macrofagen, reuscelformatie etc. Mochten er, tegen de verwachting in, toch dusdanig ernstige reacties op het materiaal optreden, waardoor wij het niet wenselijk achten om verder te gaan, zal deel 2 van deze proef komen te vervallen.

DEEL 2: aangezien ons uiteindelijke doel is een mesh te ontwikkelen voor intraperitoneaal gebruik bij herniae cicatricialis willen wij vervolgens de 5 verschillende meshes intraperitoneaal plaatsen in een rattenmodel. In andere studies (deels door onze eigen onderzoeksgroep) hebben wij gezien dat intraperitoneale plaatsing van synthetische meshes leidt tot complicaties als adhesievorming, fistelvorming en infecties.^{3,4}

Conform deel 1 zullen wij de ratten verdelen in 5 experimentele groepen en 1 controlegroep. De meshes zullen nu intraperitoneaal geplaatst worden en resultaat wordt geëvalueerd na 7 en 30 dagen. Per rat kunnen wij één mesh plaatsen vanwege verschillende redenen. Ten eerste is het belangrijk dat bij het plaatsen van meerdere mesh grafts een tussenruimte van zo'n 1,5cm betracht zou moeten worden. Daarbij willen wij een voldoende grote mesh om genoeg materiaal te kunnen oogsten voor verdere bepalingen (zowel histologisch als immunohistochemisch). Ook is de afmeting van de mesh belangrijk om het mediane laparotomielitteken volledig met een mesh te bedekken. Als laatste is het zo dat bij een kleine mesh de invloed van de fixerende techniek waarschijnlijk te groot wordt in verhouding tot het oppervlak van de mesh zelf.

Na euthanasie zal het macroscopisch gescoord worden op ingroei en adhesievorming en zal materiaal afgenomen worden voor verdere bepalingen (zowel histologisch als immunohistochemisch). Het scoren van adhesies gebeurt op basis van een score die de uitgebreidheid, type en taaiheid van de verklevingen meeneemt.¹¹ Histologisch zal een ervaren proefdierpathologe die onbekend is met de achtergrond de reactie op de mesh grafts scoren op items zoals necrose, macrofagen, reuscelformatie etc.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is peer reviewed door MUMC, gezien diens uitgebreide ervaring met en onderzoek naar biomaterialen en hun biocompatibiliteit. Hij beoordeelt deze aanvraag als een wetenschappelijk valide en maatschappelijk relevante vraag. Daarnaast is dit werk onderdeel van het welke ook beoordeeld is op zijn technische en wetenschappelijke merites. De voorgestelde experimenten voor het beantwoorden

van deze vraag worden beoordeeld als adequaat en ter zake doende. De wetenschappelijke onderbouwing bestrijkt in voldoende mate de huidige probleemstelling en de voorgestelde experimenten voorzien in het mogelijk vinden van een antwoord. Het gehele project wordt derhalve als positief beoordeeld.

7 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Wistar ratten, 250-300 gram, afkomstig van *[illegible]*, zullen gebruikt worden. Deze proefdieren hebben onder andere voldoende huidoppervlakte op hun rug om 2 meshes per rat te implanteren en voldoende buikoppervlakte om een mesh intraperitoneaal te plaatsen. De proefdieren worden aan het eind van het experiment geëuthanaseerd.

7b. Sexe

De sexe is niet van belang

7c. Aantallen (Volgens de formule van L. Sachs, $\alpha = 0.05$, power = 0.80 ($\beta = 0.20$))

DEEL 1: Uitkomstmaat foreign body reaction met spreiding van 14% en effect 20% geeft $n = 15,7 * (14/20)^2 = 7,63$. Het totaal aantal benodigde metingen per groep komt dan op $7,63 \approx 8$, aangezien we 2 matjes per dier kunnen implanteren betekent dit dat er $8/2 = 4$ dieren per groep nodig zijn. Het betreft 5 groepen met verschillende matjes en 1 controlegroep, welke op 2 verschillende tijdstippen geëvalueerd worden. Dit geeft 6 groepen x 2 tijdstippen x 4 dieren = 48 dieren

DEEL 2: Uitkomstmaat adhesievorming met spreiding van 10% en een effect van 15% geeft $n = 15,7 * (10/15)^2 = 6,98$. Het totaal aantal benodigde dieren per groep betreft dus 6,98. Rekening houdend met een uitval van 10% (conform ervaringen uit eerdere experimenten) betekend dit dat er $6,98/0,90 = 7,75 \approx 8$ dieren bijkomen. Het betreft 5 groepen met verschillende matjes en 1 controlegroep, welke op 2 verschillende tijdstippen geëvalueerd worden. Dit geeft 6 groepen x 2 tijdstippen x 8 dieren = 96.

Deel 1 + Deel 2

In **TOTAAL** zijn er voor het gehele experiment **144 (96+48)** proefdieren nodig.

8 Dierproef

8. Experiment

DEEL 1: Deze proef bestaat uit het subcutaan plaatsen van meshes van (SOP 1). Zoals al eerder genoemd willen we de reactie van het weefsel op het materiaal scoren en ernstige negatieve reacties uitsluiten. Dit willen wij doen op 7 en 30 dagen. Deze twee tijdstippen zijn nodig om de acute ontstekingsreactie te bekijken en om te kijken naar de weefselrespons kort na de operatie en na een langere follow-up.

Na euthanasie worden ontstekingsreacties en mogelijke infecties macroscopisch bekeken en wordt weefsel afgenomen voor histologie (SOP3).

Tijdsschema

Dag 0: subcutane plaatsing van de matjes.

Dag 7: offeren eerste 24 dieren.

Dag 30: offeren overige 24 dieren.

	Procedure	Dag	Procedure	Dag	Procedure	Dag
Proefdieren (N=48)	Inbrengen matjes	Dag 0	Offeren 24 ratten	Dag 7	Offeren 24 ratten	Dag 30

DEEL 2: Deze proef bestaat uit het intraperitoneaal plaatsen van meshes van (SOP 3). Per rat wordt 1 mesh intraperitoneaal geplaatst. De onderbouwing van de twee tijdstippen is overeenkomstig DEEL 1 van het experiment met als toevoeging dat wij bij intraperitoneale plaatsing ook de adhesievorming na 7 en 30 dagen willen evalueren. Adhesies zullen na euthanasie macroscopisch gescoord worden. Vervolgens worden meshes uitgenomen en geprepareerd voor histologische verwerking (SOP 4).

Tijdsschema

Dag 0: intraperitoneale plaatsing van matjes

Dag 7: offeren eerste 42 dieren

Dag 30: offeren overige 42 dieren

	Procedure	Dag	Procedure	Dag	Procedure	Dag
Proefdieren (N=84)	Inbrengen matjes	Dag 0	Offeren 42 ratten	Dag 7	Offeren 42 ratten	Dag 30

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

isoflurane/O₂: 3-4% inductie en 2,5% voor handhaven van narcose. De ogen worden beschermd met oogzalf (VitA, terramycine of chloramphenicol oogzalf, afhankelijk van beschikbaarheid).

9b. Pijnbestrijding

Pre-operatief wordt buprenorphine 0.1mg/kg s.c. toegediend (werkingsduur $\pm$ 12 uur). Aan het einde van de dag en de volgende dag (in de morgen en op het einde van de middag) wordt de injectie van buprenorphine herhaald.

Indien de proefdieren de dag na de laatste dosis nog tekenen van pijn vertonen, wordt nog één dag buprenorphine gegeven. Indien de volgende dag nog steeds duidelijk pijn wordt het dier geëuthanaseerd. Indien de pijn meer dan twee dagen na de operatie begint dan wordt pijnstilling gegeven. Bij onvoldoende resultaat en/of bereiken van humane eindpunten wordt het dier geëuthanaseerd. Humane eindpunten voor postoperatieve pijn na abdominale chirurgie worden gedefinieerd a.h.v. Roughan en Flecknell¹²:

Trekkingen: voorbijgaande, willekeurige spierspasmen. Vooral voorkomend wanneer proefdieren slapen (of minstens ogen dicht hebben) of wanneer de proefdieren ineengedoken zitten.

Rug krommen: katachtig strek gedrag, frequent samenhangend met rond wandelen of draaien.

Wankelen/vallen: vooral wanneer dier probeert de omgeving te verkennen. Een ongewoon snelle overgang naar ineengedoken zitten.

In elkaar krimpen: spieraanspanning waardoor een concave abdominale flank te zien is. Komt meestal voor samen met wandelen en direct voor of na krommen van de rug.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De ratten worden aan het eind van het experiment geëuthanaseerd middels CO₂/O₂ op te voeren tot 100% CO₂. Vervolgens worden op het kadaver de nodige handelingen uitgevoerd.

Humane eindpunten worden bereikt bij langer dan twee dagen postoperatief ernstig ongerief, meer dan 20% verlies van lichaamsgewicht, een ernstig ontstoken operatiewond en andere aandoeningen waarbij ernstig ongerief bestaat. De eerste week na de operatie worden de proefdieren elke dag gewogen, daarna elke week. Sowieso worden bij wondinfectie en andere ziektebeelden bij ernstig ongerief de dierenarts geconsulteerd.

De mate van ongerief is **matig/ernstig** tijdens de eerste twee dagen na de operatie. Na deze periode is in onze ervaring dat de proefdieren nauwelijks enig significant ongerief hebben van de operatie. Verder worden er tot het einde van de proef geen handelingen uitgevoerd op de proefdieren. In het geval van het bereiken van humane eindpunten wordt in overleg met de proefdierdeskundige beslist over euthanasie.

<i>Aard</i>	<i>Duur</i>	<i>Frequentie</i>	<i>Ernst</i>
Pre-operatieve injectie (pijnbestrijding)	2 min	1	02
Operatie (plaatsen matje onder narcose)	15 min	1	04
Bijkomen uit anaesthesie	15 min	1	04
Post-operatief ongemak (max. 48h)	48h	1	04
Post-operatieve pijnbestrijding (injectie)	2 min	3	02
Euthanasie middels CO ₂	15 min	1	02

<i>Aard</i>	<i>Duur</i>	<i>Frequentie</i>	<i>Ernst</i>
Pre-operatieve injectie (pijnbestrijding)	2 min	1	02
Operatie (plaatsen matje onder narcose)	20 min	1	04
Bijkomen uit anaesthesie	15 min	1	04
Post-operatief ongemak (max. 48h)	48h	1	04
Post-operatieve pijnbestrijding (injectie)	2 min	3	02
Euthanasie middels CO ₂	15 min	1	02

In het verleden hebben wij al ervaring opgedaan met het subcutaan (DECnr: 2010-157) en intraperitoneaal (DECnr: 2009-104 en 2007-185) plaatsen van meshes. De toen ervaren mate van ongerief was matig/ernstig en steeds aanwezig tot niet langer dan 1 dag postoperatief.

De ratten kunnen in groep worden gehuisvest onder standaardomstandigheden in het CPV: bedding, kooiverrijking, voedsel en vocht ad lib. De proefdieren worden dagelijks door VO bezocht in de week na de ingrepen. Daarna zullen de proefdieren regelmatig (minimaal 1x per week) worden bezocht. Bij calamiteiten wordt de VO gewaarschuwd. De ingrepen vinden plaats in het CPV.

Zowel VO als VVO zijn art.9 bevoegd en hebben reeds uitgebreide ervaring met intraperitoneale ingrepen in ratten. In het bijzonder geldt hierbij de expertise opgedaan in voorgaande DEC protocollen (2009-104, 2007-185 en 2010-157) en het feit dat beiden als danwel effectief werkzaam zijn.

Zie bijlage.

Eventueel een kopie bijvoegen.

1. DuBay DA, Wang X, Adamson B, et al. Mesh incisional herniorrhaphy increases abdominal wall elastic properties: a mechanism for decreased hernia recurrences in comparison with suture repair. *Surgery* 2006; 140(1):14-24.
2. Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP, et al. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. *N Engl J Med* 2000; 343(6):392-8.
3. Shankaran V, Weber DJ, Reed RL, 2nd, et al. A review of available prosthetics for ventral hernia repair. *Ann Surg* 2011; 253(1):16-26.
4. Kayaoglu HA, Ozkan N, Hazinedaroglu SM, et al. Comparison of adhesive properties of five different prosthetic materials used in hernioplasty. *J Invest Surg* 2005; 18(2):89-95.
5. Burger JW, Luijendijk RW, Hop WC, et al. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. *Ann Surg* 2004; 240(4):578-83; discussion 583-5.
6. Morvan C, Andeme-Onzinghi C, Girault R, et al. Building flax fibres: more than one brick in the walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 2003; 41:935-944.
7. Stamboulis A, Baillie CA, Peijs T. Effects of environmental conditions on mechanical and physical properties of flax fibers. *Composites: Part A* 2001; 32:1105-1115.
8. Greenberg JJ. Can infected composite mesh be salvaged? *Hernia* 2010; 14(6):589-92.
9. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2005; 76A(2):431-438.
10. Junge K, Binnebosel M, von Trotha KT, et al. Mesh biocompatibility: effects of cellular inflammation and tissue remodelling. *Langenbecks Arch Surg* 2011.
11. AdhesionScoringGroup. Improvement of interobserver reproducibility of adhesion scoring systems. Adhesion Scoring Group. *Fertil Steril* 1994; 62(5):984-8.
12. Roughan JV, Flecknell PA. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 2001; 90(1-2):65-74.

Bijlage 1 SOP

SOP 1 – subcutane plaatsing van de matjes

Materialen:

Gasanesthesieapparaat
 Mesh grafts 1,5x2,0cm
 Scheerapparaat
 Jodiumoplossing 2%
 0.9% NaCl, steriel
 Operatiekleding en steriele afdekdoeken
 Steriele gazen
 Steriele scalpel nr. 10
 Steriele bladen nr. 10 en 11
 Steriele operatie schaarjes
 Steriele wondhaakjes
 Hechtdraad en naald
 Vycril 4 – 0
 Steriele naaldvoerder

Procedure

Buprenorfine injectie. De rat wordt onder anesthesie gebracht mbv gasanesthesie, de ogen behandeld met oogzalf, de rug geschoren en de huid gedesinfecteerd met een 2%

jodiumoplossing. Het dier wordt op een verwarmd matje gelegd en bedekt met afdekdoeken, behalve de rug. Er wordt een incisie van 2cm gemaakt op de rug van het dier en 2 subcutane pockets (1 op de linker flank en 1 op de rechter flank) worden gemaakt. De meshes worden in de pockets ingebracht op ongeveer 2 cm van de incisie, de meshes worden verder niet gefixeerd. De huid wordt intracutaan gesloten.

SOP 2 – euthanasie (deel 1)

Materialen

- Scalpel nr. 10
- Blad nr. 10
- CO₂ installatie van het CPV
- Scharen
- Flesjes met formaldehyde

Procedure

De rat raakt eerst buiten bewustzijn door een bevochtigd mengsel van CO₂/O₂ (6:4) tot bewusteloosheid en sterft daarna door inhalatie van 100% CO₂. Het oogsten van het materiaal en omliggende weefsel wordt **niet** gedaan onder steriele omstandigheden. De mesh grafts worden gelokaliseerd en eerst wordt macroscopisch gestoord op inflammatie en infectie. Vervolgens worden de mesh grafts met 10 mm van omringend weefsel geëxplanteerd. De weefsels worden vervolgens in een flesje met formaldehyde opgeslagen.

SOP3- intraperitoneale plaatsing van matjes

Materialen:

- Gasanesthesieapparaat
- Mesh grafts
- Scheerapparaat
- Jodiumoplossing 2%
- 0.9% NaCl, steriel
- Operatiekleding en steriele afdekdoeken
- Steriele gazen
- Steriele scalpel nr. 10
- Steriele bladen nr. 10 en 11
- Steriele operatie schaarjes
- Steriele wondhaakjes
- Hechtdraad en naald
 - Vycril 4 – 0
 - Vycril 2 – 0
 - Prolene 6 – 0
- Steriele naaldvoerder

Procedure:

Buprenorfine injectie. De rat wordt onder anesthesie gebracht mbv gasanesthesie, de ogen behandeld met oogzalf, het abdomen geschoren en de huid gedesinfecteerd met een 2% jodiumoplossing. Het dier wordt op een verwarmd matje gelegd en bedekt met afdekdoeken, behalve het abdomen. Het abdomen wordt d.m.v. een mediane incisie over 4 cm geopend. De mesh graft wordt intraperitoneaal ingebracht en gefixeerd tegen de buikwand met 2 prolene hechtingen. Hierna worden het peritoneum en de fascia gesloten middels vicryl. De huid wordt intracutaan gesloten.

SOP 4 – euthanasie (deel 2)

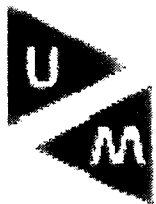
Materialen

Scalpel nr. 10
Blad nr. 10
CO₂ installatie van het CPV
Scharen
Flesjes met formaldehyde

Procedure

De rat raakt eerst buiten bewustzijn door een bevochtigd mengsel van CO₂/O₂ (6:4) tot bewusteloosheid en sterft daarna door inhalatie van 100% CO₂. Het oogsten van het materiaal en omliggende weefsel wordt **niet** gedaan onder steriele omstandigheden.

De mesh graft wordt gelokaliseerd, het peritoneum geopend en de verklevingen macroscopisch gescoord. Vervolgens worden de mesh graft met een marge van ~ 10 mm van omliggend weefsel uitgesneden. Het specimen wordt dan in twee helften verdeeld en in een flesje met formaldehyde opgeslagen.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

... , voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-...

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 19-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*In vivo biocompatibiliteit van*
de DEC vergadering van 15 juli 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt op het voorblad bij "type aanvraag", aan te geven dat dit een nieuwe aanvraag is en geen pilot.
- Bij punt 7c verzoekt de DEC de uitval niet over het totaal te berekenen, maar per groep en verzoekt de aantallen daarna aan te passen (ook op voorblad).
- De DEC verzoekt bij punt 9b het woord "duidelijk" te verwijderen.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. (bijkomen van de operatie en het leven met een implantaat, enzovoort) dient eveneens vermeld te worden.
- De DEC vraagt zich af op welke wijze de standaardisatie en kwaliteit van de matjes geborgd is.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-098, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

/Voorzitter DEC-UM



Dierexperimenten Commissie
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
6200 MD Maastricht

BETREFT: DEC 2011-098

Uw referentie.

Maastricht, 03-08-2011

Geachte l

Geachte leden van de Dierexperimenten Commissie,

Naar aanleiding van uw vragen en opmerkingen aangaande project 2011-098 *"In vivo biocompatibiliteit van*
bericht ik u graag het volgende:

- Op het voorblad hebben wij het type aanvraag aangepast van "pilot" naar "nieuwe aanvraag"
- Bij punt 7c hebben wij de aanpassingen, zoals door u voorgesteld gedaan. De tussentijdse aantallen zijn niet afgerond, waardoor het totale aantal dieren op 141 komt
- Bij punt 9 is het woord "duidelijk" verwijderd
- Bij punt 10a hebben wij een tabel toegevoegd met de aard, ernst, duur en frequentie van het ongemak, zoals door u voorgesteld.
- Betreffende de vraag over de wijze van standaardisatie en kwaliteit van de matjes: de matjes zijn ontwikkeld in samenwerking met fabrikanten van reeds bestaande en in de praktijk gebruikte mesh grafts en producerende bedrijven. Verder hebben wij in het verleden reeds onderzoek verricht naar de manieren van sterilisatie van het materiaal en de in vitro biocompatibiliteit van het materiaal. Aangezien wij de ontwerpen van onze baseren op reeds bestaande en uitgebreid onderzochte mesh grafts en we de steriliteit en in vitro biocompatibiliteit van onze ontwerpen kunnen garanderen zijn wij van mening dat de kwaliteit en standaardisatie van onze meshes gewaarborgd is.
- Daarnaast is op het voorblad als overige uitvoerende toegevoegd.

Hopende u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben,

Met vriendelijke groet,

From: I
Sent: dinsdag 20 september 2011 10:07
To: -
Subject: FW: Project 2011-098-w
Attachments: Begeleidende brief DEC2011-098.docx; DEC aanvraag 2011-098 - .doc; DEC voorblad 2011-098 .doc

Geachte onderzoeker, beste

De DEC heeft je herziene versie bekeken en heeft nog de volgende opmerkingen:

- De berekening van de uitval klopt niet, dit moet zijn:

berekening van uitval klopt niet (eindresultaat van 8 klopt wel)

$10\% \times 6,98 = 0,70$ dieren bijkomen. Elke groep dient dus uit $6,98 + 0,70 = 7,68$ proefdieren

dit moet zijn $6,98 / 0,90 = 7,75 = 8$ dieren per groep

dat moet wel met 8 gerekend worden, anders nog te weinig dieren per groep

Dit geeft 6 groepen $\times$ 2 tijdstippen $\times$ 7,68 dieren = $92,16 \approx 93$ dieren.

dit moet zijn 6 grp $\times$ 2 tijdsp $\times$ 8 = 96 dieren totaal

Let op dat de aantallen op het voorblad corresponderen met de aantallen bij 7c, anders aanpassen.

-Bij punt 10- in de tabel- wordt het bijkomen van de operatie niet genoemd, de DEC heeft eerder gevraagd dit wel te noemen.

Dus graag aanpassen.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk secretaris

Postbus 616- 6200 MD Maastricht T 043

E-mail: I

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

From: I
Sent: dinsdag 13 september 2011 13:52
To: I
Subject: Re: Project 2011-098-w

Beste

Zoals zojuist telefonisch besproken, stuur ik hierbij de herziene versie. De wijzigingen zijn toegelicht in de begeleidende brief en gemarkeerd op het voorblad en in de tekst zelf.

Met vriendelijke groet,

20-9-2011

Dierexperimenten Commissie
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
6200 MD Maastricht

BETREFT: DEC 2011-098

Uw referentie: i

Maastricht, 20-09-2011

Geachte

Geachte leden van de Dierexperimenten Commissie,

Naar aanleiding van uw vragen en opmerkingen aangaande project 2011-098 *"In vivo biocompatibiliteit van*
t bericht ik u graag het volgende:

- Bij punt 7c hebben wij de aanpassingen, zoals door u voorgesteld, verwerkt. De berekening van de groepsgroottes in Deel 2 komt nu uit op 8 dieren per groep. Het totaal aantal dieren voor Deel 2 komt nu uit op 96 dieren en het totaal aantal dieren voor de hele studie op 144 dieren. Het aantal dieren is ook op het voorblad gewijzigd.
- Bij punt 10a hebben wij in de tabel toegevoegd: de aard, ernst, duur en frequentie van het ongemak bij ontwaken uit anesthesie, zoals door u voorgesteld.
- Zowel de hierboven genoemde wijzigingen als de wijzigingen voorgesteld in jullie vorige brief zijn in het protocol in grijs gemarkeerd.

Hopende u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben,

Met vriendelijke groet,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht

1

043-

22-09-2011

Project: *Onderzoek naar in vivo biocompatibiliteit van*

DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM

T (043)

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies**.

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-098

Diersoort: rat

Aantal dieren: 144

Einddatum: 22-09-2015

Postadres

Postbus 616

6200 MD Maastricht

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vicevoorzitter DEC-UM