

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-157

Ontvangen: 24-11-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
30-11-2011	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:

Biocompatibility of gold microspheres in injectable bone cement

startdatum 12-12-2011

einddatum⁹ 12-12-2015

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			Art 9	
4. overige uitvoerenden			Anders: PI	
5.			Anders: SI	

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	exp	exp					
Diersoort	02	02					
Stam	Wistar	Wistar					
Construct / mutatie ?	Nee	Nee					
Herkomst (leverancier) *	01	01					
Aantal	16	16					
Geslacht	M/V	M/V					
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee 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					

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Biocompatibility of gold microspheres in injectable bone cement

1. Doel van de proef.

Osteoporose wordt gekarakteriseerd door een vermindering in botmassa en verstoring van de bot-architectuur. Eén van de gevolgen hiervan is een verhoogd risico op fracturen, onder andere van wervelfracturen.¹ Deze wervelfracturen zijn een belangrijk sociaal en economisch probleem in de westerse landen met \$440 miljoen aan directe kosten in Europa alleen.¹⁻³ Een effectieve en minimaal invasieve behandelingsmethode van deze wervelfracturen is het injecteren van een medicinaal cement in de fractuur om pijnverlichting en stabilisering van de fracturen te bewerkstelligen, vertebroplastiek genaamd.^{2,4}

Een belangrijke eigenschap van deze "injectable bone cements" (IBC's) voor deze toepassing is onder andere een goede visualisatie bij röntgencontrole.^{3,5,6} Om dit te bereiken wordt er over het algemeen een contrastmedium als BaSO₄ gebruikt. Het toevoegen van deze typen anorganische contrastmedia aan het cement zorgt echter wel voor een verandering van de mechanische kenmerken van het cement. Nadelen van het toevoegen van dit contrastmiddel zijn onder andere een verandering in de viscositeit van het materiaal en een veranderde immuunreactie op het IBC.^{2,7}

In het verleden zijn er al veel in vivo en in vitro onderzoeken gedaan naar het gebruik van gouden nanopartikels als contrastmiddel bij onder andere de diagnostiek en behandeling van kanker.^{8,9} Onze hypothese is dat deze gouden nanopartikels ook gebruikt kunnen worden als contrastmiddel toegevoegd aan een botcement gebruikt voor vertebroplastiek. Derhalve zijn er door de van de Universiteit Maastricht gouden microspheres ontwikkeld, gouden nanopartikels gecoat in het veel gebruikte PMMA cement, als contrastmiddel voor onder andere deze toepassing. Zodoende willen wij een studie doen naar biocompatibiliteit van deze gouden microspheres onder andere in combinatie met het botcement om toe te werken naar een klinische toepassing.

In vivo studie naar biocompatibiliteit van botcement met gouden microspheres na 7 en 30 dagen en daarmee ernstige weefselreacties op het combinatiepreparaat uitsluiten.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Fracturen gerelateerd aan osteoporose zijn een groot gezondheidsprobleem binnen de ouder wordende populatie, één op de twee vrouwen en één op de vijf mannen boven de vijftig krijgt er op enig moment in zijn leven mee te maken. Dit resulteert in een aantal van 9 miljoen fracturen direct gerelateerd aan osteoporose per jaar waarvan ongeveer de helft optreedt in de westerse wereld. Van deze fracturen zijn de wervelfracturen de meest voorkomende in de leeftijdscategorie tussen de 50 en 79 jaar.^{1,7}

De momenteel meest gangbare behandeling van deze wervelfracturen betreft een vertebroplastiek, bij deze behandeling wordt vloeibaar cement in de fractuur geïnjecteerd, welk moet leiden tot een verlichting van pijnklachten en het voorkomen van uitbreiding van de fractuur.¹⁰⁻¹² De typen cement die gebruikt worden voor deze behandeling zijn echter niet specifiek ontwikkeld voor deze toepassing. Het betreft cement reeds gebruikt bij heup- en knie-operaties en heeft niet de specifieke eigenschappen welke nodig zijn voor een goede behandeling van wervelfracturen. Een van de belangrijkste eigenschappen die een cement nodig heeft voor gebruik bij een vertebroplastiek is een

goed contrast bij röntgendoorlichting.^{2,13} De huidige contrastmiddelen welke toegevoegd worden aan het cement (voornamelijk BaSO₄) zorgen voor een dusdanige verandering van de mechanische kenmerken van het materiaal, dat er niet meer gesproken kan worden van een ideaal cement voor vertebroplastiek.⁷

Het is dus belangrijk om te zoeken naar nieuwe materialen en nieuwe contrastmiddelen om een optimale behandeling van osteoporotische wervelfracturen te bewerkstelligen. Op dit moment is er nog niets bekend over het gebruik van gouden nanopartikels als contrastmiddel bij een vertebroplastiek. er is in de literatuur al veel bekend over het gebruik van dit materiaal in onder andere de diagnostiek en behandeling van kanker en bij behandeling van andere aandoeningen.^{8,9,14} Onze eigen in vitro onderzoeken met deze nanopartikels laten zien dat deze geen negatieve effecten hebben op de mechanische eigenschappen van het cement en daarmee dus potentieel een goed alternatief zijn voor de huidige contrastmiddelen. Wij verwachten mede gezien de reeds bekende resultaten met dit materiaal, dat dit mogelijk kan leiden tot een verbetering in de behandeling van osteoporotische wervelfracturen. Gezien de huidige trend naar vergrijzing en de sociale en economische gevolgen van osteoporose in de samenleving vinden wij dit onderzoek van groot maatschappelijk en wetenschappelijk belang voor een steeds groter wordende 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 de combinatie van deze stoffen nog niet bekend is binnen de moderne geneeskunde, is het nog niet mogelijk om dit onderzoek op patiënten uit te voeren. Daarnaast is het bij patiënten niet mogelijk om het materiaal na de gestelde follow-up weer te verwijderen voor verdere weefselsanalyses, dit zou immers verwijdering van de geïnjecteerde wervel betekenen, iets dat medisch en ethisch niet mogelijk is.

4. Ethische afweging

Zoals bij maatschappelijke relevantie reeds is aangegeven is dit onderzoek mogelijk een stap in de richting naar een meer optimale behandeling van osteoporotische wervelfracturen. Dit zou grote voordelen kunnen hebben voor een groeiende groep patiënten. Vanwege de eigenschappen van dit combinatiepreparaat, betere injecteerbaarheid en betere controle over het te injecteren materiaal en een behoud van de belangrijke mechanische eigenschappen van het oorspronkelijke cement, bestaat de mogelijkheid om deze groep patiënten beter te behandelen met minder complicaties dan tot nu toe gedaan kon worden.

Indien deze combinatie tussen gouden microspheres en het reeds bekende cement in vivo goed verdragen wordt, kan dit een opmaat zijn voor verdere onderzoeken naar een beter toegespitste behandeling van osteoporotische wervelfracturen.

Voor de proefdieren betekent dit dat de te gebruiken materialen afzonderlijk en als combinatiepreparaat subcutaan in de flank van het dier geplaatst worden. 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)

gescoord en wordt weefsel afgenomen voor histologische evaluatie. 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 de proef" en "2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang". Osteoporose en dan met name de fracturen gerelateerd aan osteoporose zijn een belangrijk gezondheidsprobleem in de ouder wordende populatie. In het bijzonder vrouwen boven de vijftig lopen een grote kans om ooit in hun leven een fractuur ten gevolge van osteoporose op te lopen. Met een prevalentie van 12% in de populatie tussen de 50 en 79 jaar is een osteoporotische wervelfractuur de meest voorkomende complicatie van osteoporose.^{1,7} De gevolgen van deze wervelfracturen zijn met name pijn ter hoogte van de fractuur, lengteverlies, instabiliteit van de wervelkolom en kyfose. Deze kunnen uiteindelijk resulteren in een vermindering van de kwaliteit van leven mits niet goed behandeld.¹⁵

Indien conservatieve behandeling van deze fracturen faalt, kan er gekozen worden voor een meer invasieve behandeling. Vertebroplastiek met kyphoplastiek is hiervoor ontwikkeld. De techniek bestaat uit het creëren van hoogte in de wervel door middel van het opblazen van een ballon om vervolgens cement in de gecreëerde ruimte te spuiten.^{13,15} De momenteel gebruikte cementen voor deze toepassingen bestaan vooral uit acrylaten (bijvoorbeeld PMMA) en zijn oorspronkelijk bedoeld voor het fixeren van prothesen in een bot.⁷

De eigenschappen welke een cement nodig heeft bij gebruik voor een vertebroplastiek komen echter niet overeen met de eigenschappen welke nodig zijn bij bijvoorbeeld een heupprothese. Een van de complicaties welke kan ontstaan bij een vertebroplastiek is lekkage van het materiaal in het spinale kanaal of in de bloedsomloop. Derhalve is een goede radiologische controle tijdens het inspuiten noodzakelijk om deze complicaties te voorkomen.^{2,13} Om het cement goed te kunnen visualiseren bij doorlichting, dient er dus een contrastmiddel toegevoegd te worden aan het cement. Het meest gebruikte is BaSO₄, een anorganisch contrastmiddel, soms toegevoegd in concentraties tot wel 30% van het hele combinatiepreparaat.² Een groot nadeel van het toevoegen van deze contrastmiddelen is dat het de mechanische eigenschappen van het cement verandert. Bij hoge concentraties BaSO₄ resulteert dit in een verminderde kracht van de gerepareerde fracturen, een veranderde viscositeit van het materiaal en een veranderde immuunrespons op het materiaal.^{2,15} Het is dus belangrijk om een cement of contrastmiddel te ontwikkelen, waarbij goede visualisatie middels röntgenfoto's bereikt kan worden zonder dat daarvoor buitensporig grote hoeveelheden anorganisch contrastmiddel nodig is.

Het gebruik van gouden nanopartikels als contrastmiddel zou een zeer goed alternatief kunnen zijn voor de huidige anorganische contrastmiddelen. Goud wordt al jaren gebruikt in verschillende medische toepassingen, onder andere als dentale prothese of in de behandeling van ziekten als reumatoïde artritis.¹⁶ Met de introductie van gouden nanopartikels zijn daar nog veel meer potentiële toepassingen voor goud binnen de geneeskunde bijgekomen. Momenteel wordt er veel onderzoek gedaan naar het gebruik van deze nanopartikels binnen de diagnostiek en behandeling van kanker. Binnen deze tak van de geneeskunde wordt goud gezien als een mogelijk nieuw contrastmiddel, aangezien het in vergelijking met de reeds gebruikte contrastmiddelen een veel beter contrast kan geven bij lagere concentraties.^{8,16,17} Eerder in vivo onderzoek met gouden nanopartikels liet daarbij ook zien dat bij lage concentraties de nanopartikels veilig te gebruiken zijn, zonder negatieve reacties in de dieren. Bij hogere concentraties wordt er wel een trend gezien in

gewichtsverlies bij de dieren maar geen duidelijke cytotoxiciteit.^{8,14} Wij denken dan ook dat het gebruik van goud als contrastmiddel in de bovengenoemde botcementen een beter resultaat geeft van de uiteindelijke vertebroplastiek dan de huidige middelen. Doordat er minder contrastmiddel nodig is om hetzelfde resultaat te bereiken, denken wij dat er minder negatieve effecten op de materiaalkwaliteit op zullen treden. Om cytotoxiciteit verder te voorkomen heeft de afdeling op de Universiteit Maastricht zogenaamde gouden microspheres ontwikkeld. Dit zijn gouden nanopartikels met een PMMA coating. Hierdoor moet het vrijkomen van het goud uit het uiteindelijke cement voorkomen worden. Omdat de coating van PMMA is, vindt er ook betere binding plaats tussen het contrastmiddel en het uiteindelijke cement, welke de materiaaleigenschappen ten goede komt.

Voordat we kunnen kijken naar verdere klinische toepassingen van dit combinatiepreparaat, zullen we eerst uit moeten sluiten dat deze materialen en met name het combinatiepreparaat leiden tot ernstige afweerreacties. Derhalve willen wij conform de procedures uit een eerder protocol (DEC-2011-098) de in vivo biocompatibiliteit van deze stoffen afzonderlijk en als combinatiepreparaat evalueren. Hiervoor willen wij dus 4 diergroepen gebruiken waarin we de verschillende componenten willen vergelijken:

Ten eerste willen wij uitsluiten dat de Au-spheres (gouden microspheres) zelf leiden tot een ernstige foreign body reaction in de raten en of de toevoeging van goud leidt tot voldoende contrast. Deze Au-microspheres willen wij vergelijken met de controle-spheres (PMMA-spheres). Vervolgens willen wij hetzelfde doen bij het combinatiepreparaat, waarbij we schijfjes van het eindproduct (PMMA met AU-spheres) vergelijken met schijfjes van het controlecement (PMMA met BaSO₄). Dit geeft ons dan uiteindelijk 2 experimenten met elk 2 groepen:

1. Au-spheres vs. controle-spheres en
2. Goud-cement vs. controle-cement

De Au-spheres zijn ontwikkeld aan de hand van resultaten uit het in vitro onderzoek. Het goud-cement bestaat uit een mengsel van de PMMA-spheres, Au-spheres en PMMA welke na het mengen gedroogd zijn en verwerkt tot schijfjes met een dikte van 2 mm. Het controle-cement bestaat uit het commercieel beschikbare PMMA met BaSO₄, ook verwerkt in schijfjes van dezelfde grootte. Om later de mate van contrast te kunnen vergelijken tussen de groepen, zullen wij bij experiment 1 bij elke rat aan de linker zijde de Au-spheres implanteren en aan de rechter zijde de controle-spheres. Bij experiment zal dit op dezelfde wijze gebeuren met het Goud-cement en het controlecement. De tijdsduur waarop we de materialen willen evalueren zal, conform DEC 2011-098, 7 en 30 dagen bedragen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is **peer-reviewed** door de , gezien diens uitgebreide ervaring met en onderzoek naar biomaterialen en hun biocompatibiliteit. Zij beoordelen deze aanvraag als een wetenschappelijk valide en maatschappelijk relevante vraag. 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.

6 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam/herkomst/eindbestemming

Wistar ratten, 250-300 gram, herkomst geregistreerde fok, zullen gebruikt worden. Deze proefdieren hebben onder andere voldoende huidoppervlakte op hun rug om per rat het materiaal in twee subcutane pockets in de flank te implanteren. De dieren worden na het experiment geëuthanaseerd.

7b. Sekse

De sekse is niet van belang

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

EXPERIMENT 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 bij elk dier zowel het experimentele materiaal als het controlemateriaal implanteren komen we voor dit experiment uit op **8 dieren** per tijdspunt. Bij twee tijdspunten betekent dit dat er in totaal $8 \text{ dieren} \times 2 \text{ tijdspunten} = \mathbf{16 \text{ dieren}}$ nodig zijn

EXPERIMENT 2: Bij experiment 2 geldt dezelfde uitkomstmaat en berekening waardoor we voor experiment 2 ook uitkomen op **8 dieren** per tijdspunt, met in totaal $8 \text{ dieren} \times 2 \text{ tijdspunten} = \mathbf{16 \text{ dieren}}$.

In TOTAAL hebben we voor beide experimenten samen $16 \text{ dieren} + 16 \text{ dieren} = \mathbf{32 \text{ dieren nodig}}$

7 Dierproef

8. Experiment

Deze proef bestaat uit het subcutaan plaatsen van de materialen (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 en weefselrespons te bekijken en chronische ontsteking te beoordelen. Op beide tijdstippen wordt een deel van de dieren geofferd voor macroscopische controle van de ontsteking gevolgd door explantatie van de materialen en omliggend weefsel voor histologische en immunohistochemische analyse. Vanwege de explantatie van het materiaal met uittrekken van het omliggende weefsel is het dus niet mogelijk om beide tijdstippen in 1 dier te meten.

Na euthanasie worden op beide tijdstippen ontstekingsreacties en mogelijke infecties macroscopisch bekeken en wordt weefsel afgenomen voor histologie (SOP3). Bij elk experiment zal daarnaast 1 dier per groep na euthanasie gebruikt worden voor radiologische controle van het contrastmateriaal.

EXPERIMENT 1

Tijdsschema

- Dag 0: subcutane plaatsing microspheres (16 dieren)
Dag 7: offeren eerste 8 dieren waarvan 1 dier ingevroren wordt voor contrastopnamen
Dag 30: offeren laatste 8 dieren waarvan 1 dier ingevroren wordt voor contrastopnamen

EXPERIMENT 2

Tijdsschema

- Dag 0: subcutane plaatsing cement (16 dieren)
Dag 7: offeren eerste 8 dieren, waarvan 1 dier ingevroren wordt voor contrastopnamen
Dag 30: offeren laatste 8 dieren waarvan 1 dier ingevroren wordt voor contrastopnamen

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 0.01-0,05 mg/kg s.c. toegediend (werkingsduur $\pm$ 12 uur). Aan het einde van de dag (na 8-12 uur) en de volgende dag (elke 8-12 uur) 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 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 Flecknell¹⁸:

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

10a. Ongerief

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.

EXPERIMENT 1+2:

Aard	Duur	Frequentie	Ernst
Preoperatieve Injectie (pijnbestrijding)	2 min	1	02
Operatie (plaatsen materiaal onder narcose)	15 min	1	04
Bijkomen uit anesthesie	15 min	1	04
Postoperatief ongemak (max. 48h)	48h	1	04
Postoperatieve pijnbestrijding (injectie)	2 min	3	02
Euthanasie middels CO ₂	15 min	1	02

10b. Welzijnsevaluatie

In het verleden hebben wij al ervaring opgedaan met het subcutaan (DECnr: 2010-157 en 2011-098) plaatsen van materialen. De toen ervaren mate van ongerief was matig/ernstig en steeds aanwezig tot niet langer dan 1 dag postoperatief.

11. Verzorging en huisvesting

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.

12. Deskundigheid

Zowel VO als VVO zijn art.9 bevoegd en hebben reeds uitgebreide ervaring met chirurgische 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 chirurgisch assistent dan wel chirurg werkzaam zijn.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlage.

Relevante literatuur

1. Compston J. Osteoporosis: social and economic impact. *Radiol. Clin. North Am.* 2010;48(3):477–482.
2. Boelen EJH, Lewis G, Xu J, et al. Evaluation of a highly-radiopaque iodine-containing acrylic bone cement for use in augmentation of vertebral compression fractures. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86(1):76–88.
3. Lewis G. Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: state-of-the-art review. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006;76(2):456–468.
4. Kallmes DF, Comstock BA, Heagerty PJ, et al. A randomized trial of vertebroplasty for osteoporotic spinal fractures. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(6):569–579.
5. Heini PF, Berlemann U. Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S205–13.
6. Lewis G. Viscoelastic properties of injectable bone cements for orthopaedic applications: state-of-the-art review. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011;98(1):171–191.
7. Pepiol A, Teixidor F, Saralidze K, et al. A highly radiopaque vertebroplasty cement using tetraiodinated o-carborane additive. *Biomaterials.* 2011;32(27):6389–6398.
8. Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *British Journal of Radiology.* 2006;79(939):248–253.
9. Zhang X-D, Guo M-L, Wu H-Y, et al. Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy. *Int J Nanomedicine.* 2009;4:165–173.
10. Rodrigues DC, Ordway NR, Ma CR-J, Fayyazi AH, Hasenwinkel JM. An ex vivo exothermal and mechanical evaluation of two-solution bone cements in vertebroplasty. *Spine J.* 2011;11(5):432–439.
11. Hernández L, Gurruchaga M, Goñi I. Injectable acrylic bone cements for vertebroplasty based on a radiopaque hydroxyapatite. Formulation and rheological behaviour. *J Mater Sci: Mater Med.* 2009;20(1):89–97.
12. Boger A, Bohner M, Heini P, Verrier S, Schneider E. Properties of an injectable low modulus PMMA bone cement for osteoporotic bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008;86(2):474–482.
13. Loeffel M, Ferguson SJ, Nolte L-P, Kowal JH. Vertebroplasty: experimental characterization of polymethylmethacrylate bone cement spreading as a function of viscosity, bone porosity, and flow rate. *Spine.* 2008;33(12):1352–1359.
14. Zhang X-D, Wu H-Y, Wu D, et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomedicine.* 2010;5:771–781.
15. Hulme PA, Krebs J, Ferguson SJ, Berlemann U. Vertebroplasty and kyphoplasty: a systematic review of 69 clinical studies. *Spine.* 2006;31(17):1983–2001.
16. Thakor AS, Jokerst J, Zavaleta C, Massoud TF, Gambhir SS. Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. *Nano Lett.* 2011;11(10):4029–4036.
17. Jackson PA, Rahman WNW, Wong CJ, Ackerly T, Geso M. Potential dependent superiority of gold nanoparticles in comparison to iodinated contrast agents. *Eur J Radiol.* 2010;75(1):104–109.
18. Roughan JV, Flecknell PA. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain.* 2001;90(1-2):65–74.

SOP 1 – subcutane plaatsing van de materialen

Materialen:

- Gasanesthesieapparaat
- Experimentele materialen
- 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 materialen worden in de pockets ingebracht op ongeveer 2 cm van de incisie. De huid wordt intracutaan gesloten.

SOP 2 – euthanasie (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. Het materiaal wordt gelokaliseerd en eerst wordt macroscopisch gestoord op inflammatie en infectie. Vervolgens wordt het materiaal met 10 mm van omringend weefsel geëxplanteerd. De weefsels worden vervolgens in een flesje met formaldehyde opgeslagen.

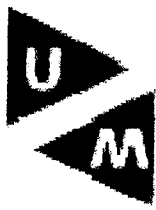
SOP 3 – euthanasie (2)

Materialen

- CO₂ installatie van het CPV
- Droogijs

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. Direct na euthanasie wordt 1 rat per experiment ingevroren in droogijs en meegenomen voor contrastopnamen. Indien het zich voordoet wordt hiervoor een rat gebruikt die wegens bereiken van humane eindpunten voortijdig geëuthanaseerd wordt.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon:

Uw referentie:

Onze referentie : I

Maastricht, 24-11-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Biocompatibility of gold microspheres in injectable bone cement*", is op de DEC vergadering van 18 november 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

- 1) De DEC verzoekt de namen bij punt 6 te verwijderen en als PI op het voorblad te vermelden. Het is niet de bedoeling dat er verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.

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 2011-157, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*

043-3881108

30-11-2011

Project: Biocompatibility of gold microspheres in injectable bone cement.

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

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

Bezoekadres**Projectnummer:** 2011-157**Diersoort:** rat**Aantal dieren:** 32**Einddatum:** 30-11-2015**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