

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-127

Ontvangen: 30-10-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
08-11-2011	Nieuw

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	Kostenplaats 9106 WBS PC-00045
--------------	-----------------------------------

Titel van het onderzoek:

Histologische en radiologische veranderingen door bestraling van de mandibula en os frontale in verschillende doses bij Göttinger minivarkens; wat is de grens voor het ontstaan van osteoradionecrose

startdatum 01.01.2012

einddatum ⁹ 01.12.2013Duur van de proef¹⁰: 29 weken

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

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	01						
Diersoort	42						
Stam	Göttinger minipig						
Construct / mutatie ?	-						
Herkomst (leverancier) *	02						
Aantal	20						
Geslacht	M/V						
Dieren immuuncompetent ?	Ja ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	18m/35kg						
Doel van de proef *	37						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	09						
Anesthesie *	04						
Pijnbestrijding *	04						
Mate ongerief *	04						
Toestand dier einde exp*	01						

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Histologische en radiologische veranderingen door bestraling van de mandibula en os frontale in verschillende doses bij Göttinger minivarkens; wat is de grens voor het ontstaan van osteoradionecrose.

1. Doel van de proef.

Het doel van ons onderzoek is vast stellen wat precies de effecten zijn van bestraling op het bot, en wanneer osteoradionecrose optreed.

Over de kwaliteit van het kaakbot na bestraling zijn verrassend weinig objectieve gegevens bekend. De experimenten zijn tot zover met ratten, muizen of konijnen uitgevoerd. Het bot van deze dieren is echter niet goed vergelijkbaar met dat van mensen. Vandaar onze keuze voor het mini-varken. Dit dier benadert biologisch veel dichter het bot van mensen.

Met het experiment beogen wij:

1. De reactie van bestraald bot op het plaatsen van implantaten te bestuderen bij een lichter en zwaarder bestralingsschema. Bepalen van een grenswaarde tot welke dosis kan worden geïmplant
2. Radiologisch de kwaliteit van het bestraalde bot te beoordelen en te correleren aan de mate van weefsel schade zoals wordt vastgesteld door het weefselonderzoek.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Patiënten die voor een hoofdhalstumor zijn bestraald moeten zo optimaal mogelijk worden gerehabiliteerd. Voor de rehabilitatie zijn vaak de implantaten noodzakelijk voor de verankering van de prothesen. Echter door de bestraling is het vaak niet mogelijk implantaten te plaatsen. De grens waarboven wij geen implantaten meer plaatsen is min of meer arbitrair bepaald en gebaseerd op een beperkt aantal retrospectieve studies. Daarom is het nodig om deze grens beter te bepalen waardoor waarschijnlijk meer patiënten met implantaten kunnen worden gerehabiliteerd. Dit is van groot belang voor de orale functie en de kwaliteit van leven van de patiënt.

Over de biologische reactie van bot en botcellen op bestraling is weinig bekend, meer specifiek over hoeveel van de straling in het bot doordringt bij verschillende stralingsdoses. Ons onderzoek zal ten aanzien hiervan waardevolle informatie opleveren. Met deze informatie kan niet alleen de grens beter worden vastgesteld maar ook het bestralingsplan van hoofdhalsoncologie patiënten verder worden geoptimaliseerd zodat de kans op osteoradionecrose verkleind kan worden.

Met de kennis uit dit experiment kan in de toekomst verder onderzoek worden gedaan naar (medicamenteuze) behandeling of preventie van osteoradionecrose. Dit zou voor de patiënten met osteoradionecrose de kwaliteit van leven sterk verbeteren en de groep die implantaten kan ontvangen vergroten.

3. Alternatieven

Omdat van de biologie van bot en botcellen weinig bekend is in combinatie met bestraling, is een levend model noodzakelijk en kan niet met bijvoorbeeld een computersimulatie gewerkt worden. Onderzoek in mensen is gezien de permanente beschadiging in gezonde proefpersonen niet mogelijk. Invasief onderzoek bij oncologie patiënten is eveneens niet mogelijk omdat er vooralsnog geen variaties in bestralingen mogelijk zijn zonder gevaar te lopen te tumor te onderbehandelen. Onderzoek in een celcultuur is niet representatief daar het in het bijzonder om de botmatrix gaat welke in meer of mindere mate de stralen absorbeert. De structuur van de botmatrix is in combinatie met cellen moeilijk na te bootsen vooral omdat de voeding van de cellen in gevaar kan komen.

4. Ethische afweging

Door in dit onderzoek verschillende vragen te onderzoeken halen wij zoveel mogelijk uit dit experiment. Zowel fundamenteel onderzoek naar de biologie van het bot en botcellen alsook toegepast onderzoek naar de reactie van kaakbot op implantaten. Bijkomstig worden ook non-invasieve onderzoeken naar osteoradionecrose gerelateerd aan de histologie. Dit levert waardevolle informatie op voor bestraalde hoofdhals oncologie patiënten.

In de toekomst kunnen deze gegevens gebruikt worden voor onderzoek naar een (medicamenteuze) behandeling of preventie van osteoradionecrose.

Het ongerief voor de varkens zal relatief beperkt zijn daar de bestralingen op kleine volumes zal plaatsvinden waardoor wij weinig mucositis of dermatitis verwachten. Andere bijwerkingen verwachten wij niet. Van de extracties en implantaten zullen de varkens beperkt nabezwaren hebben. De varkens zullen standaard pijnstilling krijgen.

De winst voor hoofdhals oncologie patiënten is dat er meer duidelijkheid komt over het effect van verschillende bestralingsschema's op het bot, en het bestaande schema op basis van de resultaten kan worden aangepast. Ook de grens voor osteoradionecrose zal beter gedefinieerd worden zodat waarschijnlijk bij meer patiënten implantaten geplaatst kunnen worden voor orale of faciale rehabilitatie.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Jaarlijks worden er in Nederland ongeveer 2400 nieuwe hoofdhals oncologie patiënten behandeld. De behandeling van tumoren van het hoofdhalsgebied bestaat uit bestraling of chirurgie met aanvullende bestraling.

Osteoradionecrose

Door bestraling treden er in de weefsels rondom de tumor blijvende veranderingen en beschadigingen op. Onder andere verslechtert de doorbloeding, waarbij er een relatief gebrek aan zuurstof en andere voedingsstoffen ontstaat met hierdoor gestage degeneratie van het weefsel¹. Zowel hypergefractioneerde bestralingen (72-80Gray) als gefractioneerde bestralingen (64-72Gray) leiden in 5% van de gevallen tot osteoradionecrose². Het mechanisme hiervoor is een door hypoxie geïnduceerde hypovascularisatie, hypocellulairiteit en fibrose^{1,3}. Osteoradionecrose is een diagnose die gesteld wordt op basis van klinische symptomen in combinatie met beeldvormend onderzoek. Een veelgebruikte stadiering van osteoradionecrose is beschreven door Jacobson.

Stadium I kleine oppervlakkige botaantasting met dehiscentie van huid of slijmvlies.

Stadium II grotere en dieper botaantasting van merg en schors met een redelijk grote dehiscentie van huid of slijmvlies.

Stadium III devitalisatie van de volledige dikte van het bot met resorptie van de onderrand van de mandibula, fistels naar extraoraal of pathologische fractuur van de mandibula.

Met name osteoradionecrose van de mandibula is een gevreesde complicatie, waarbij de ernstiger vormen alleen met ingrijpende chirurgische reconstructies behandeld kunnen worden⁴.

Rehabilitatie

De implantaat gedragen prothese is een betrouwbare behandeling voor het herstel van orale functie⁵. De implantaten bestaan in de kern uit titanium maar zijn aan het oppervlak bedekt met een dunne laag titaniumoxide, wat keramische eigenschappen heeft⁶. Dit verklaart de zeer goede hechting aan bot, beter bekend als osseointegratie⁷.

Faciale rehabilitatie wordt bij voorkeur verkregen met een op implantaten gedragen prothese (epithese). De kwaliteit van leven wordt hierdoor aanmerkelijk meer verbeterd dan door gelijkde prothesen^{8,9}. Rehabilitatie van de bestraalde zone met geosseointegreerde implantaten kan in gevaar komen door het ontstaan van osteoradionecrose¹⁰. Als de te implanteren regio meer dan 50 Gray effectieve dosis heeft gehad is er een verhoogd risico op falen van de osseointegratie^{11,12}. Trauma is een belangrijke factor voor het ontstaan van osteoradionecrose en infectie van het bot lijkt een secundair verschijnsel¹³. Derhalve is iedere chirurgische interventie zoals het plaatsen van een implantaat een risico op het ontstaan van osteoradionecrose¹⁴.

Het meeste onderzoek van de effecten van de bestraling op bot is echter op ratten en konijnen uitgevoerd¹⁵⁻²². Tot zover is er maar één experiment met minipigs en bestraling²³. Hierbij is geen histologische evaluatie verricht. Met het beoogde dierexperiment wordt de histologie van bestraald bot bestudeerd bij verschillende bestralingsdoses. Daarnaast worden ook de effecten van bestraling op de osseointegratie bestudeerd. Hiermee kan ook in relatie met beeldvorming de grens waarboven men niet meer implantaten kan plaatsen worden bepaald. Zo verkrijgen we aangrijpingspunten om de orofaciale rehabilitatie te optimaliseren en osteoradionecrose mogelijk te voorkomen of de omvang ervan te beperken.

Bestralingsschema

Daar de eerder genoemde grens van 50Gray gebaseerd is op retrospectieve studies is er gekozen voor equivalent dosis van 50Gray om de reactie van het bot op de bestraling te onderzoeken met en zonder chirurgische interventie. Daarnaast is gekozen voor een equivalent dosis van 70Gray, zeker bij deze dosis verwachten wij bij alle varkens bovengenoemde histologische reacties van het bot waar te nemen¹⁵. Beide doses zijn op vergelijkbaar niveau met bestralingsdoses van hoofdhals

tumoren. Daarnaast is er een groep met 25Gray waarbij wij biologische reacties van het bot op relatief lage dosis bestuderen. Bij de berekening van de effectieve fractie dosis is uitgegaan van een alfa-beta ratio van 3, aangezien dit getal als gemiddelde waarde gebruikt wordt voor late reacties van normale weefsels op bestraling, zoals osteoradionecrose.

Metingen tijdens de proef

Botdichtheid wordt beïnvloed door bestraling en kan goed gemeten worden met een Kwantitatieve CT. Hierbij wordt een CT gemaakt waarmee doormiddel van een gekalibreerd fantoom de botdichtheid kan worden berekend^{24, 25}. Met deze methode wordt tijdens de dierproef het effect van de verschillende bestralingsdoses op de botdichtheid bestudeerd door aan het begin en aan het einde van de proef een kwantitatieve CT te verrichten en het verschil tussen deze te berekenen.

Laser-dopplerflowmetry is een goede en reproduceerbare manier om de doorbloeding van bot te meten en is tijdens het plaatsen van de implantaten eenvoudig uit te voeren²³. Met deze methode wordt tijdens het plaatsen van de implantaten de doorbloeding van het bot gemeten en wordt gekeken naar het effect van de verschillende bestralingsdoses op de doorbloeding van het bot.

Osteoradionecrose met aantasting van het merg kan het beste worden gediagnosticeerd met een MRI met contrast. Er is dan een afwijkende signaalintensiteit ter plaatse van het merg zichtbaar met ook destructie van de cortex^{26, 27}. Tijdens de dierproef worden bij aanvang en aan het einde van de proef een MRI van de varkens gemaakt om de mate van aantasting van merg te onderzoeken.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Deze dierproef is beoordeeld en geaccordeerd door de volgende personen:

.....

De verantwoordelijke onderzoeker van dit project is:

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Göttinger minipig. Varken benaderd qua botbiologie het beste humaan bot²⁸.

Minipig is door zijn kleine gestalte en gewicht als volwassen dier goed te hanteren terwijl de biologie vergelijkbaar is met andere varkens. Daarnaast blijkt uit onze ervaring dat doordat de minipig's rond 18 maanden de skeletgroei stopt de biologie van het bot met bot van volgroeide mensen vergelijkbaar is.

Herkomst:

Ellegaard Göttingen Minipigs A/S te Denemarken

Indien mogelijk kan een eerder gebruikt proefdier hiervoor worden gebruikt mits het skelet en weke delen van het aangezicht niet behandeld zijn

Bestemming:

Aan het einde van de proef worden de dieren opgeofferd.

7b. Sexe

Er is geen voorkeur voor sexe van de proefdieren.

7.c. Aantallen

Groep	Aantal dieren	Equivalent dosis
I	5	0
II	5	25
III	5	50
IV	5	70

Het experiment bestaat uit 4 groepen van 5 varkens. Het is door het ontbreken van de histologische evaluatie in het experiment van Verdonck niet mogelijk om gebruik te maken van historische controles.

De verschillende onderdelen van het experiment zijn redelijk veilig voor de dieren echter een uitval van 10% is gebaseerd op de relatief grote hoeveelheid narcosen (5). Het onderzoek is een beschrijvend onderzoek, hierdoor is er geen powerberekening mogelijk. Op basis van eerdere experimenten kunnen wij wel de verwachte uitkomsten onderbouwen.

Histologie

Op basis van de publicatie van Fenner is de verwachting, dat alle dieren uit groep IV necrose, fibrosering en frequent voorkomende lege osteocyten lacunae vertonen. In groep III verwachten wij dit ook aan te treffen. Deze drie kenmerken zijn bewijzend voor osteoradionecrose. In de groepen I en II verwachten wij geen histologische afwijkingen te zien¹⁵.

Aan de interventie zijde is te verwachten dat in groep IV geen contact aanwezig is tussen bot en implantaat en dat de implantaten zijn ingebed in fibreus weefsel. In de groepen I, II en III verwachten wij bij alle implantaten osseointegratie²⁰.

Metingen

Bij de laser-dopplerflowmetrie verwachten wij een verminderde doorbloeding in de groepen III en IV ten opzichte van I en II²³.

Van de botdichtheidsquotient verwachten wij een toename in de groepen III en IV en geen toename in de groepen I en II²⁵.

Beeldvorming

In de groepen I en II zijn er op CT en MRI geen afwijkingen te verwachten. In groep III verwachten wij behoudens een toename van de densiteit van het bot op de CT opname geen afwijkingen²⁵. Op de MRI met contrast in deze groep zal een vervetting van het merg zichtbaar zijn. In groep IV zal tenminste erosie van de cortex zichtbaar zijn en mogelijk aan de zijde van de interventie

onderbrekingen van de cortex. Op de MRI zal in deze groep en met name aan de interventie zijde afwijking van de signaal intensiteit van het merg met verhoogde signaalintensiteit op de T2 gewogen opname en aankleuring na toediening van contrast.

7 Dierproef

8. Experiment

Vier gerandomiseerde groepen van ieder 5 volwassen 'Göttingen mini-pigs' worden met een interval van 1 week met 6,5; 9,7 of 11,8 Gray twee keer bestraald tot een equivalente dosis van respectievelijk 25, 50 en 70 Gray. Één groep functioneert als controle groep.

Naast de negatieve controle groep wordt ook bij de bestraalde dieren in een niet bestraald gebied extra-orale implantaten geplaatst als negatieve controle.

Om bias te voorkomen wordt telkens één dier van elke groep in een cohort opgenomen. Elk cohort bestaat telkens uit 5 dieren.

Er is helaas geen mogelijkheid van historische controles. Hiertoe is geen materiaal beschikbaar.

Voorafgaand aan de radiotherapie krijgen alle dieren een individueel vervaardigd bestralingsmasker aangemeten voor correcte positionering. Geplaatst in dit masker wordt er een CT-scan gemaakt. Deze CT is om het doel volume van de stereotactische bestraling te identificeren. Ook wordt op deze CT de dichtheid van het bot bepaald. Voorts krijgen de dieren een MRI(3 Tesla) met en zonder contrast in het bestralingsmasker. De MRI is klinisch het onderzoek van keuze om oseeoradionecrose te diagnosticeren.

Na positionering in het bestralingsmasker worden de dieren voor iedere fractie met twee anterior-posterior opponerende velden van 5 x 7 cm bestraald met een 6 MV lineaire versneller met een micromultileaf-collimator. De hele mandibula, wordt met 95% isodosis bedekt, 6,5; 9,7 of 11,8 Gray wordt aan het isocentrum toegekend. Separaat wordt centraal op het os frontale een elektronen bron met een diameter van 6 centimeter geplaatst en wordt ook hier volgens hetzelfde schema bestraald.

13 weken na bestraling worden aan de linkerzijde van de mandibula de premolaren en molaren verwijderd en een viertal tandwortelimplantaten geplaatst. De wonden worden primair gesloten. Ter plaatse van het os frontale worden aan de linker zijde van het bestraalde gebied vier extraorale implantaten geplaatst. Dorsaal van de bestraalde zone op het os frontale worden in niet bestraald bot vier extraorale implantaten geplaatst en de wond wordt primair gesloten.

26 weken na de bestraling wordt van alle dieren opnieuw een MRI met en zonder contrast in het bestralingsmasker, waarna de dieren worden opgeofferd. Direct hierna wordt in het bestralingsmasker een native CT gemaakt. De mandibula en os frontale met de bedekkende weke delen worden geoogst. Hierna worden de weefsels gefixeerd met 1,5% paraformaldehyde. De monsters worden apart gekleurd met een Hematoxyline en Eosine kleuring en Toluodine blauw. Er wordt semikwantitatief gekeken naar fibrose, lege lacunae en osseointegratie van de implantaten.

Op week 5, 21 en 27 worden fluorochroom markers toegediend om de activiteit van botmetabolisme op de verschillende momenten bij het histologisch onderzoek zichtbaar te maken²⁹.

De toestemming van de
- en ziekenhuishygiëne zal worden aangevraagd.

Zie Tabel 1 Volgorde en verloop van het experiment.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie voor de ingreep, CT, MRI en bestralingen met endotracheale intubatie:

Peroperatieve bewaking middels ETCO₂, Pulsoximetrie en ECG(drie afleiding).

Premedicatie Zoletil 5-8mg/kg i.m.

Inleiding: Propofol 4-8 mg/kg LG i.v. Fentanyl 4µg/kg LG i.v.

Onderhoud: Propofol 9 mg/kg per uur LG i.v. Fentanyl 8µg/kg per uur LG i.v.

Beademen artificieel met 40% zuurstof.

Vochtbeleid: infuus voor controle elektrolytenbalans: 5-10ml/kg LG/uur

Bij de inleiding starten de dieren met antibiotica profylaxe en dit wordt gedurende 3 dagen gecontinueerd in overleg met de dierenarts CPV. De anesthesie kan worden aangepast in overleg met de dierenarts CPV.

Bij injectie van de fluorescentie markers lichte sedatie met:
Zoletil 5-8mg/kg i.m.

9b. Pijnbestrijding

Voor de pijn na de ingreep wordt buprenorfine 0,01-0,05mg/kg LG i.m. of i.v. ieder 6-12 uur de eerste 72 uur toegedient. Hierna kunnen, indien de dieren tekenen van pijn vertonen, de injecties gecontinueerd worden in overleg met de dierenarts. In verband met de interactie met het botmetabolisme kan er voor de postoperatieve pijnstilling geen gebruik worden gemaakt van NSAID's. Dagelijks wordt gedurende een week rapportage van het welbevinden van het dier gemeten subjectief op basis van onrustig gedrag en objectief door de dieren dagelijks te wegen. Na de bestralingen zal, als er mucositis ontstaat, ook buprenorfine worden toegedient.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Aan het einde van het experiment volgt onder sedatie het MRI en CT onderzoek, aansluitend zullen de dieren geëuthanaseerd worden met thiopental 150mg/kg i.v.

Humane eindpunten zijn

Hevige mucositis waardoor de dieren geen voeding meer tot zich kunnen nemen en een gewichtsverlies hebben van meer dan 10%.

Een infectie welke niet op antibiotica verbeterd.

In alle gevallen en in geval van andere ziekten wordt altijd de dierenarts in consult gevraagd.

10a. Ongerief

Het ongerief van de verschillende onderdelen van het experiment worden hieronder genoemd:

Gebeurtenis	Groep	Duur ongerief	Frequentie	Intensiteit code
Vervaardigen van maskers, CT en MRI	I t/m IV	3 uur	1	gering/matig ongerief (02)
Bestralingen	II t/m IV	2 uur	2	gering/matig ongerief (02)
Mucositis na de bestraling	III	2 weken	1	gering/matig ongerief (02)
Mucositis na de bestraling	IV	2 weken	1	matig/ernstig ongerief (04)
Ingreep (extracties en implantaten):	I t/m IV	4 uur	1	matig/ernstig ongerief (04)
Tot ongeveer drie dagen na de ingreep:	I t/m IV	72 uur	1	matig ongerief (03)
Infiltratie calceïne labels	I t/m IV	0,5 uur	3	gering ongerief (01)
laatste MRI en CT	I t/m IV	2 uur	1	gering/matig ongerief (02)

10b. Welzijnsevaluatie

Er is geen welzijnsevaluatie daar dit de eerste keer is dat dit experiment wordt uitgevoerd.

11. Verzorging en huisvesting

Huisvesting van de varkens is in groepen van vier in een binnenruimte op een stevige dichte vloer met stro.

De dieren krijgen standaard mini-varkensvoer afhankelijk van het gewicht en drinkwater ad libitum verstrekt met automatische drinkbakken. De dieren worden op gezette tijden gewogen. Als voorbereiding op de narcose worden de dieren 12 uur vooraf nuchter gehouden. Water staat wel naar wens ter beschikking.

Extra aandacht krijgen de dieren ten aanzien van de orale intake de eerste twee weken tijdens en na de bestralingen daar zij door eventuele mucositis verminderde intake kunnen hebben. Gedurende deze periode worden de dieren dagelijks gewogen. Indien er sprake is van pijn zal er aanvullende pijnstilling worden gegeven. Indien de dieren welke bestraald zijn mucositis hebben worden zij apart verzorgd zodat zij geen strijd moeten leveren om aan rust en voeding te komen. De voeding wordt dan ook met water zacht gemaakt om de voedselintake te bevorderen.

Na de bestralingen volgt een periode van observatie en zo ook na de chirurgische interventie. Deze tijd zullen de dieren in de stal van het CPV worden gehuisvest met vrij toegang tot water en een vaste hoeveelheid voeding.

Na drie en zes maanden zullen de dieren opnieuw in de in pandige CPV huisvesting verblijven respectievelijk voor de chirurgische interventie, röntgen diagnostiek en euthanasie.

Na de bestraling geven de dieren geen straling af en is er voor de verzorgers geen gevaar voor straling.

12. Deskundigheid

Drs. Lucas Poort is de hoofdonderzoeker en artikel 9 gecertificeerd.

De onder punt 6 genoemde personen welke nauw betrokken zijn bij dit experiment hebben ieder op hun gebied zeer ruime expertise en de eerste 6 ook met dierexperimentele onderzoeken.

Onder begeleiding en alleen in aanwezigheid van al gedurende het experiment tenminste één WESP-student aanwezig zijn, deze zal assisterende taken uitvoeren.

De artikel 12 functionaris van dit experiment is medewerkers CPV.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

SOP 1 – Anesthesie

Anesthesie voor de ingreep met endotracheale intubatie:

Peroperatieve bewaking middels ETCO₂, Pulsoximetrie en ECG.

Intraveneuze toegang voor medicatie en vocht via venflon.

Premedicatie Zoletil 5-8mg/kg i.m.

Inleiding: Propofol 4-8 mg/kg LG i.v. Fentanyl 4µg/kg LG i.v.

Onderhoud: Propofol 9 mg/kg per uur LG i.v. Fentanyl 8µg/kg per uur LG i.v.

Beademen artificieel met 40% zuurstof.

Vochtbeleid: infuus voor controle elektrolytenbalans: 5-10ml/kg LG/uur

De anesthesie kan worden aangepast in overleg met de dierenarts CPV.

SOP 2 – Radiologie

Anesthesie voor het transport met endotracheale intubatie:

Bewaking middels ETCO₂, Pulsoximetrie en ECG.

Intraveneuze toegang voor medicatie en vocht via venflon.

Premedicatie Zoletil 5-8mg/kg i.m.

Inleiding: Propofol 4-8 mg/kg LG i.v. Fentanyl 4µg/kg LG i.v.

Onderhoud: Propofol 9 mg/kg per uur LG i.v. Fentanyl 8µg/kg per uur LG i.v.

Beademen artificieel met 40% zuurstof.

Vochtbeleid: infuus voor controle elektrolytenbalans: 5-10ml/kg LG/uur

De anesthesie kan worden aangepast in overleg met de dierenarts CPV.

Transport naar de afdeling radiologie voor vervaardigen van CT en/of MRI met en zonder contrast

Maken van een alginaatafdruk van de onderkaak om een goede tandgedragen boorsjabloon te kunnen vervaardigen.

Materialen:

Venflon

Pulsoximeter en ECG

gadolineum verzorgd door de afdeling radiologie

transport behuizing en anesthesie apparatuur

bestralingsmasker

afdruklepels, alginaat, mengnap, waterbeker + water, spatel

SOP 3 – Bestraling

Sedatie voor het transport:

Bewaking middels ETCO₂, Pulsoximetrie en ECG.

Intraveneuze toegang voor medicatie en vocht via venflon.

Premedicatie Zoletil 5-8mg/kg i.m.

Inleiding: Propofol 4-8 mg/kg LG i.v. Fentanyl 4µg/kg LG i.v.

Onderhoud: Propofol 9 mg/kg per uur LG i.v. Fentanyl 8µg/kg per uur LG i.v.

Beademen artificieel met 40% zuurstof.

Vochtbeleid: infuus voor controle elektrolytenbalans: 5-10ml/kg LG/uur

De anesthesie kan worden aangepast in overleg met de dierenarts CPV.

Transport naar de afdeling radiotherapie voor vervaardigen van bestralingsmasker en CT voor planning van de bestraling. Transport naar de afdeling radiotherapie voor de bestralingen.

Materialen:

pulsoximeter en ECG

transport behuizing en anesthesie apparatuur

bestralingsmasker

SOP 4 – Chirurgische interventie

Er wordt gewekt onder aseptische condities.

Bij de inleiding starten de dieren met antibiotica profylaxe en dit wordt gedurende 3 dagen

gecontinueerd in overleg met de dierenarts CPV. De locatie van de incisies worden met lidocaïne

2% geïnfiltreerd

Os frontale

Reiniging en desinfectie rondom het operatie gebied, percutaan markeren van het periost met methyleen blauw van het bestraalde gebied. Hierna de operatieve toegang tot het voorhoofdsbeen, de incisie in de bedekkende huid en het daaronder liggende periost wordt zo boogvormig omsneden, zodat deze wekedelen lap craniaal gesteeld blijft en ongedwongen teruggeslagen kan worden.

Na het doorlopen van de verschillende boorfases worden 3 extraorale implantaten dorsaal van de bestraalde zone op een afstand van 5 cm geplaatst.

In de bestraalde zone wordt in de linker halve cirkel op de vooraf geplande positie eveneens 3 extraorale implantaten geplaatst.

Na afloop van de operatie wordt de huid teruggeslagen en met Vicryl 1-0 losgeknoopt gesloten. De wond wordt nabehandeld met wondverband uit spuitbus.

mandibula

In de mond wordt na het plaatsen van een keeltampon (10x10 gaas) met een scalpel aan de linker zijde in de onderkaak op de overgang tussen tandvlees en gebitselementen de incisie gemaakt met naar mesiaal en distaal een ontlasting. Na het afschuiven van het mucoperiost worden voorzichtig de premolaren verwijderd en worden de botranden verlaagd tot deze een gelijkmatig plateau vormen. Hierna wordt na het doorlopen van de verschillende boorfases met een boormal drie intra-orale implantaten geplaatst diameter 4.1mm en lengte 10 mm. Na het ruim spoelen van de wond wordt deze met vicryl 3/0 losgeknoopt gesloten. Na het uitzuigen van de mondkeelholte wordt de keeltampon verwijderd en kan het dier wakker worden.

Laser-doppler flowmetrie

Tijdens het plaatsen van de implantaten wordt op de verschillende posities na de eerste boorfase met de laser probe telkens in 4 richtingen de doorbloeding gemeten.

Materialen:

Benodigdheden voor anesthesie

Chirurgische set met Langenbeck haak

Mesjes nr 10 en nr 13 Vicryl 3/0 RB naald Vicryl 1/0 FS naald Wondspray

Laser-doppler probe, unit en computer(via PI)

Implantaat set, implantaten en boormal(via PI)

Handstuk en motor-unit(via PI)

Licocaïne 2% 10ml, methyleen blauw

SOP 5 – Toediening van de fluorescentie markers

Vooraf de toediening van de fluorescentie markers worden de varkens licht gesedeeerd met: Zoletil 5-8mg/kg i.m.

Na twee weken wordt calceïne groen (20mg/kg LG) subcutaan toegediend.

Na 15 weken wordt xylanolol oranje (90 mg/kg LG) subcutaan toegediend

Na 24 weken wordt calceïne blauw (20 mg/kg LG) subcutaan toegediend

Materialen:

calceïne groen (20mg/kg LG s.c.)

xylanolol oranje (90 mg/kg LG s.c.)

calceïne blauw (20 mg/kg LG s.c.)

spuit en naald

SOP 6 – Euthanasie

Aan het einde van het experiment volgt op de sedatie na de MRI de euthanasie. Hiervoor wordt een lethale dosis van thiopental 150mg/kg i.v. toegediend. Nadat is vastgesteld dat het varken dood is wordt de CT verricht en teruggebracht naar het CPV. Daar wordt niet-steriel de mandibula en het os frontale vrijgeprepareerd en uitgenomen. De preparaten worden in 4% formaldehyde/PBS gefixeerd.

Materialen:

Scalpel nr 10 Blad nr 10 Zaag en motor unit Thiopental 4% formaldehyde in PBS

Relevante literatuur

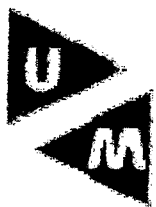
1. Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* 1983;41(5):283-8.
2. Studer G, Gratz KW, Glanzmann C. Osteoradionecrosis of the mandibula in patients treated with different fractionations. *Strahlenther Onkol* 2004;180(4):233-40.
3. Bras J, de Jonge HK, van Merkesteyn JP. Osteoradionecrosis of the mandible: pathogenesis. *American journal of otolaryngology* 1990;11(4):244-50.
4. Jacobson AS, Buchbinder D, Hu K, Urken ML. Paradigm shifts in the management of osteoradionecrosis of the mandible. *Oral oncology*;46(11):795-801.
5. Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants - past and future, 1966-2042. *Journal (Canadian Dental Association)* 2005;71(5):327.
6. Schupbach P, Glauser R, Rocci A, et al. The human bone-oxidized titanium implant interface: A light microscopic, scanning electron microscopic, back-scatter scanning electron microscopic, and energy-dispersive x-ray study of clinically retrieved dental implants. *Clinical implant dentistry and related research* 2005;7 Suppl 1:S36-43.
7. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery* 1969;3(2):81-100.
8. Schoen PJ, Reintsema H, Raghoobar GM, Vissink A, Roodenburg JL. The use of implant retained mandibular prostheses in the oral rehabilitation of head and neck cancer patients. A review and rationale for treatment planning. *Oral oncology* 2004;40(9):862-71.
9. Honda MJ, Hatanaka T, Okazaki Y, Ueda M. Long-term results of osseointegrated implant-retained facial prostheses: a 5-year retrospective study. *Nagoya journal of medical science* 2005;67(3-4):109-16.
10. Ihde S, Kopp S, Gundlach K, Konstantinovic VS. Effects of radiation therapy on craniofacial and dental implants: a review of the literature. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009;107(1):56-65.
11. Colella G, Cannavale R, Pentenero M, Gandolfo S. Oral implants in irradiated patients: a systematic review. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2007;22(4):616-22.
12. Visch LL, van Waas MA, Schmitz PI, Levendag PC. A clinical evaluation of implants in irradiated oral cancer patients. *Journal of dental research* 2002;81(12):856-9.
13. Lim AA, Karakla DW, Watkins DV. Osteoradionecrosis of the cervical vertebrae and occipital bone: a case report and brief review of the literature. *American journal of otolaryngology* 1999;20(6):408-11.
14. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer treatment reviews* 2002;28(1):65-74.
15. Fenner M, Park J, Schulz N, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg*;38(1):47-53.
16. Springer IN, Niehoff P, Acil Y, et al. BMP-2 and bFGF in an irradiated bone model. *J Craniomaxillofac Surg* 2008;36(4):210-7.
17. Khouri RK, Brown DM, Koudsi B, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plastic and reconstructive surgery* 1996;98(1):103-9.
18. Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rodel F, et al. Expression of bone morphogenetic protein 2/4, transforming growth factor-beta1, and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2005;61(4):1189-96.
19. Wurziel KK, DeWeese TL, Sebald W, Reddi AH. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *The Journal of craniofacial surgery* 1998;9(2):131-7.
20. Matsui Y, Ohno K, Michi K, Tachikawa T. Histomorphometric examination of healing around hydroxylapatite implants in 60Co-irradiated bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52(2):167-72; discussion 72-3.
21. Brasseur M, Brogniez V, Gregoire V, et al. Effects of irradiation on bone remodelling around mandibular implants: an experimental study in dogs. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2006;35(9):850-5.
22. Niehoff P, Springer IN, Acil Y, et al. HDR brachytherapy irradiation of the jaw - as a new experimental model of radiogenic bone damage. *J Craniomaxillofac Surg* 2008;36(4):203-9.
23. Verdonck HW, Meijer GJ, Laurin T, et al. Assessment of vascularity in irradiated and nonirradiated maxillary and mandibular minipig alveolar bone using laser doppler flowmetry. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2007;22(5):774-8.
24. Todisco M, Trisi P. Bone mineral density and bone histomorphometry are statistically related. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2005;20(6):898-904.
25. Verdonck HW, Meijer GJ, Nieman FH, Stoll C, Riediger D, de Baat C. Quantitative computed tomography bone mineral density measurements in irradiated and non-irradiated minipig alveolar bone: an experimental study. *Clinical oral implants research* 2008;19(5):465-8.
26. Rabin BM, Meyer JR, Berlin JW, Marymount MH, Palka PS, Russell EJ. Radiation-induced changes in the central nervous system and head and neck. *Radiographics* 1996;16(5):1055-72.
27. Tartaglino LM, Rao VM, Markiewicz DA. Imaging of radiation changes in the head and neck. *Seminars in roentgenology* 1994;29(1):81-91.
28. Pearce AJ, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European cells & materials* 2007;13:1-10.
29. Stuart AJ, Smith DA. Use of the fluorochromes xylenol orange, calcein green and tetracycline to document bone deposition and remodelling in healing fractures in chickens. *Avian diseases* 1992;36(2):447-9.

Tabel 1.

1. Aankomst en acclimatiseren
2. CT, MRI en maskers maken
3. Bestralingen
4. extracties linker mandibulaire premolaren en plaatsen intra-orale en extra-orale implantaten na laser-doppler flowmetrie
5. CT en MRI en opofferen van de dieren

Gekleurde '*' zijn injecties met respectievelijk: calcetine groen, xylenolol oranje en calceïne blauw.

Group	Week																																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41		
I	1				*												*										*		5														
II	1				*												*										*		5														
III	1				*												*										*		5														
IV	1				*												*										*		5														
I				1				*										*													*			5									
II				1				*										*													*			5									
III				1				*										*													*			5									
IV				1				*										*													*			5									
I								1					*																								*					5	
II								1					*																								*					5	
III								1					*																								*					5	
IV								1					*																								*					5	
I								1					*																								*					5	
II								1					*																								*					5	
III								1					*																								*					5	
IV								1					*																								*					5	



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:

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Histologische en radiologische veranderingen door bestraling van de mandibula en os frontale in verschillende doses bij Göttinger minivarkens; wat is de grens voor het ontstaan van osteoradionecrose*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 6 de namen van en te verwijderen. Je kunt als vervangend verantwoordelijke onderzoeker en uitvoerende van een project, niet de aanvraag zelf wetenschappelijk beoordelen.
- Bij punt 7c- De DEC vraagt zich af of een powerberekening niet gewenst is, gezien het feit dat ook (kwantitatieve) metingen worden uitgevoerd (bijvoorbeeld doorbloeding), en gegevens uit de literatuur aanwezig zijn. Dit maakt het uitvoeren van een powerberekening mogelijk en wenselijk.
- De DEC verzoekt bij punt 8 "vijf gerandomiseerde groepen" aan te passen in "4" en "4 volwassen" aan te passen in "5".
- Punt 10a- De DEC is van mening dat de groepen III en IV (Mucositis) matig/ernstig ongerief hebben. Het ongerief graag differentiëren per groep. Dit kan wellicht leiden tot een extra kolom op het voorblad.
- De DEC vraagt zich af, als de dieren niet op de CPV gehuisvest zijn, waar dan wel en wie dan het welzijn van de dieren bewaakt?

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 2011-127, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

/Voorzitter DEC-UM

Maastricht 31 oktober 2011

Geachte

.. en DEC-UM commissie,

Allereerst hartelijk dank voor de waardevolle aanvullingen op de projectaanvraag: "Histologische en radiologische veranderingen door bestraling van de mandibula en os frontale in verschillende doses bij Göttinger minivarkens; wat is de grens voor het ontstaan van osteoradionecrose." DEC aanvraag 2011-127

De aanvraag heb ik aangepast in de DEC aanvraag en duidelijk gemarkeerd.

Bij punt 6 heb ik de namen van en verwijderd.

Bij punt 7c er is een power berekening op basis van de belangrijkste uitkomst namelijk histologie (lege lacunae en fibrosering) echter deze berekening is gebaseerd op de studie van Fenner en ondanks dat het een goede studie is vind ik die niet goed vergelijkbaar met onze studie omdat de botbiologie sterk verschilt.

(We are planning a study of a continuous response variable from independent control and experimental subjects with 1 control(s) per experimental subject. In a previous study the response within each subject group was normally distributed with standard deviation 10. If the true difference in the experimental and control means is 25, we will need to study 4 experimental subjects and 4 control subjects to be able to reject the null hypothesis that the population means of the experimental and control groups are equal with probability (power) 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null hypothesis is 0.05.)

Bij punt 8 heb is het aantal varkens en het aantal groepen aangepast zodat het weer klopt met de aantallen in de rest van de tekst.

Bij punt 10a zijn de groepen III en IV opgesplitst op het punt van mucositis. Mijns inziens wordt het voorblad hierdoor niet anders omdat het ongerief in alle groepen al matig/ernstig is door de chirurgische interventie.

De dieren worden te allen tijde op een door het CPV beheerde locatie gehuisvest, dit was inderdaad niet duidelijk uit de tekst af te leiden.

Hopende uw vragen en opmerkingen voldoende beantwoordt te hebben.

Hoogachtend,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
10-11-2011

Project: Histologische en radiologische veranderingen door bestraling van de mandibula en os frontale in verschillende doses bij Göttinger minivarkens; wat is de grens voor het ontstaan van osteoradionecrose.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM

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

Bezoekadres

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

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-127

Diersoort: varken

Aantal dieren: 20

Einddatum: 08-11-2015

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