

83

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-114

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 05-09-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
07-09-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

Deelproject							
-------------	--	--	--	--	--	--	--

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

Budgetnummer	30943120E
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Hypoxie beeldvorming en therapeutisch effect van TH-302 met bestraling

startdatum 1 Oktober 2011

einddatum ⁹ 30 September 2015

Duur van de proef¹⁰: 6 mnd / jr

	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.12	
5.				Art.9/12 ⁸ Anders ⁶ :	

Diergroep	1	2	3				
ctrl/exp/sham	Exp	Exp	Exp				
Diersoort	02	02	02				
Stam	WAG/Rij	WAG/Rij	WAG/Rij				
Construct / mutatie ?	-	-	-				
Herkomst (leverancier) *	02	02	02				
Aantal	36	144	36				
Geslacht	m/v	m/v	m/v				
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja				
Leeftijd/gewicht	12w/>250g	12w/>250g	12w/>250g				
Doel van de proef *	30	30	30				
Belang van de proef *	01	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01				
Bijzondere technieken *	01	01	01				
Anesthesie *	04	04	04				
Pijnbestrijding *	04	04	04				
Mate ongerief *	03	04	04				
Toestand dier einde exp*	01	01	01				

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Hypoxie beeldvorming en therapeutisch effect van TH-302 met bestraling

1. Doel van de proef.

Solide tumoren vertonen heterogeen verspreide regio's van lage zuurstof concentratie (hypoxie) en necrose als gevolg van snelle tumor groei en onvoldoende bloed voorziening. Hypoxische gebieden hebben een 3 maal lagere gevoeligheid voor bestraling waardoor tumoren met veel hypoxie moeilijker te behandelen zijn en de prognose voor deze patiënten slechter is.

TH-302 is een nieuw ontwikkelde prodrug wat specifiek in hypoxische gebieden wordt omgezet in een actief drug. Het gevolg hiervan is dat de hoeveelheid hypoxie in de tumor zal verkleinen. Wanneer dit medicijn additief wordt gegeven in combinatie met bestraling, zal het effect van de gecombineerde behandeling mogelijk groter worden dan de twee behandelingen alleen.

Omdat het medicijn alleen in hypoxische gebieden werkt is het van belang om voor de behandeling te bepalen hoeveel hypoxie er aanwezig is in de tumor. Om dit te doen kunnen verschillende technieken worden gebruikt (zuurstof elektrode of kleuringen na biopsie-afname). Deze technieken zijn echter heel invasief, niet geschikt voor diepliggende tumoren en gevoelig voor meetfouten. Daarom wordt er steeds meer overgeschakeld op niet-invasieve beeldvormingstechnieken waarbij radioisotopen worden gebruikt. In een vorige studie (2008-135) hebben we aangetoond dat PET scan met ¹⁸F- HX4 een goede merker is voor de detectie van hypoxie.

Het doel van deze studie is:

- 1) nagaan of TH-302 het effect van bestraling vergroot
- 2) nagaan of de hoeveelheid hypoxie, te bepalen met ¹⁸F-HX4 PET-CT voor behandeling, het effect van deze combinatie behandeling kan voorspellen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



De mate van genezing (prognose) van kanker patiënten is sterk verminderd indien de tumoren van deze patiënten veel hypoxische regio's bevatten in vergelijking met patiënten die tumoren hebben met weinig hypoxische regio's. Wanneer voor de start van de behandeling de mate van hypoxie kan worden bepaald, kan de therapie hierop worden aangepast en de prognose van de patiënten worden verbeterd. Met deze studie willen we onderzoeken of de combinatie van deze twee therapieën zorgt voor een betere behandeling en of de uitkomst van de behandeling kan worden voorspeld met behulp van een niet-invasieve beeldvormingsmethode.

3. Alternatieven

Een tumor is een complexe interactie tussen verschillende fysiologische processen. Verschillende kenmerken en eigenschappen van een tumor kunnen niet *in vitro* worden nagebootst. Aanwezigheid van hypoxische en necrotische regio's bepalen onder andere de kenmerken van een tumor en de uitkomst van een behandeling. Om vergelijkbare omstandigheden van patiënten tumoren te benaderen is het van belang dat we gebruik maken van een model waarbij de complexiteit van de volledige tumor wordt bestudeerd.

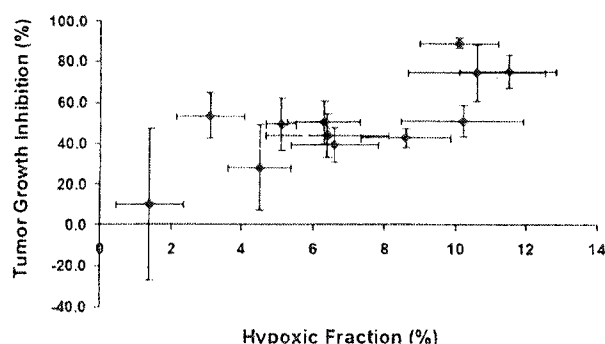
4. Ethische afweging

In deze studie wordt gemiddeld een ongerief van 3 (matig) verwacht. Tijdens de experimenten wordt gestreefd naar een minimalisatie van pijn en lijden. Door gebruik te maken van een niet-invasieve beeldvormingstechniek wordt het ongerief niet verder verhoogd. Verder zal tijdens het bestralen een afscherming van lood worden gebruikt, waardoor alleen het tumor weefsel wordt bestraald en niet de hele rat. Naar onze mening weegt het belang van dit onderzoek zwaarder door dan het veroorzaakte ongerief omdat uiteindelijk dit soort onderzoek kan leiden tot een betere behandeling van de kanker patiënt doordat een patiënt specifieke kankerbestrijding mogelijk wordt gemaakt.

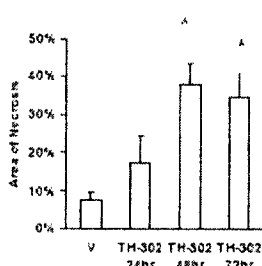
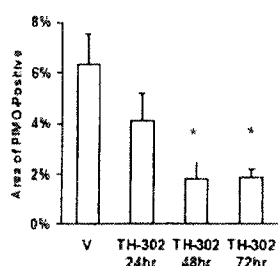
5. Wetenschappelijke onderbouwing

De aanwezigheid van hypoxische regio's heterogeen verspreid binnen een tumor heeft een grote invloed op het effect van conventionele kankerbehandelingen. Bovendien is hypoxie een onafhankelijke voorspeller voor progressie-vrije overleving bij verschillende types van kanker (1). Het ontstaan van deze hypoxische gebieden gebeurt door abnormale bloedvatvorming (2) en zijn karakteristiek voor een tumor. Deze tumor-specifieke regio's zouden als target kunnen worden gebruikt voor nieuwe medicijnen om te zorgen voor een extra therapeutisch effect in combinatie met conventionele kanker behandelingen (3). Het is daarom belangrijk om de patiënten die een potentieel voordeel hebben van een extra anti-hypoxie behandeling te kunnen selecteren.

TH-302 is een experimenteel antikanker medicijn dat alleen wordt geactiveerd bij lage zuurstofconcentraties. Omdat tumoren vaak hypoxische gebieden hebben zal het medicijn hier worden geactiveerd, een therapeutische werking hebben en de hypoxische regio in de tumor verkleinen.



Een duidelijke relatie kon reeds aangetoond worden tussen de hypoxische fractie (hoeveelheid hypoxie in een tumor) en de mate van tumor groei inhibitie wanneer TH-302 gebruikt wordt als enkelvoudige behandeling. Hieruit blijkt duidelijk dat TH-302 weinig effect heeft wanneer een tumor geen of weinig hypoxie vertoont.



Analyse van de tumor micro-omgeving kort na behandeling met TH-302 toont aan dat de hoeveelheid hypoxie tot 1/3 gereduceerd wordt vanaf 48h behandeling. Verder zien we ook dat deze daling van hypoxische regio's te verklaren is door een vervanging met necrotisch gebied. De tumor wordt dus van binnenuit kapot gemaakt.

Hypoxische gebieden in een tumor zijn minder gevoelig aan bestraling dan gebieden met een normale zuurstofconcentratie. Wanneer de hypoxische fractie in de tumor wordt verkleind met behulp van TH-302 zal het netto effect van bestraling vergroten. De hoeveelheid hypoxie heeft echter een determinerende rol in het effect van

deze gecombineerde therapieën. Wanneer voor de start van de behandeling de hypoxische fractie in een tumor wordt bepaald kan dit mogelijk het effect van de behandeling voorspellen.

Recent (DEC 2008-135) hebben we aangetoond dat 18F-HX4 een geschikte kandidaat is als hypoxie merker. De merker vertoont een goede signaal-ruis verhouding, een lage opname in normoxische weefsels en wordt snel geklaard. Heterogene 18F-HX4 opname vertoonde een sterke relatie met de hypoxische fractie berekend op basis van de gouden standaard pimonidazole. Een causaal verband werd aangetoond met de zuurstofconcentratie in de tumor; voorbehandeling met nicotinamide en carbogeen zorgde voor een verminderde opname van 18F-HX4 in de tumor, terwijl 7% zuurstof ademen (wat zorgt voor meer hypoxie) leidde tot een toename in opname.

Het doel van deze studie is: 1) nagaan of TH-302 het effect van bestraling vergroot en 2) nagaan of de hoeveelheid hypoxie, te bepalen met 18F-HX4 PET-CT voor behandeling, het effect van deze combinatie behandeling kan voorspellen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is wetenschappelijk beoordeeld door de (Lab Leadership Team) onder leiding van en vervolgens goedgekeurd. De principal investigator van dit project vanuit

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Rat, WAG/Rij, omdat in deze ratten een klinisch vergelijkbare tumor tot ontwikkeling gebracht kan worden. We maken gebruik van een syngene rhabdomyosarcoma R1 tumor model omdat er in deze tumoren duidelijk bewijs is van zowel perfusie- als diffusie-gelimiteerde hypoxie en dat er zelfs bij grotere volumes relatief weinig necrose voorkomt.

De dieren zullen geleverd worden door een van de reguliere UM leveranciers (Harlan/Charles River).

De ratten zullen aan het einde van het experiment gedood worden, en dus niet worden hergebruikt.

7b. Sexe

Voor onze experimenten is de sexe van de rat niet van belang.

7.c. Aantallen

Doelstelling 1: Bepalen optimale dosering

In deze doelstelling vragen we op basis van een beoogd verschil van 25% en een variabiliteit van 18%, rekening houdend met een power van 80% ($F=15.7$; de uitleesparameter is het effect op tumor groei) en een uitvalspercentage van 10%, 9 proefdieren aan ($N = 8.13$ zonder en 8.94 met uitvalspercentage) per dosis medicijn. We willen het effect onderzoeken van 4 verschillende doseringen (0, 25, 50 en 75 mg/kg). Voor het testen van bloed samples vragen we geen extra ratten aan, omdat dit kan gebeuren op kleine hoeveelheden bloed dat kan worden geïsoleerd tijdens de experimenten.

In totaal vragen we daarom: 9 (aantal proefdieren per groep) $\times 4$ (verschillende dosering) = **36 proefdieren** aan voor deze doelstelling

Doelstelling 2: Predictie van behandelingseffect door middel van hypoxie bepaling

In deze doelstelling vragen we 9 proefdieren per behandelgroep (beoogd verschil 25%, variabiliteit 18%, power 80% (uitleesparameter: effect op tumor groei bij verschillende behandelingen) en een uitvalspercentage van 10%).

We maken gebruik van 3 soorten behandeling: gewone lucht ademen (basaal), verhoogde zuurstof opname in de tumor (Carbogen / Nicotinamide) en verlaagde zuurstof in de tumor (7% zuurstof).

Deze behandelingen worden gecombineerd met bestraling en of TH-302 toediening (zie schema).

Behandeling	Bestraling (8 gray)	TH-302 (dosis doelstelling 1)
-	-	-
-	4	-
-	8	-
-	12	-
-	-	+
-	4	+
-	8	+
-	12	+
Carbogen / Nicotinamide	-	-
Carbogen / Nicotinamide	8	-
Carbogen / Nicotinamide	-	+
Carbogen / Nicotinamide	8	+
7% zuurstof	-	-
7% zuurstof	8	-
7% zuurstof	-	+
7% zuurstof	8	+

In totaal vragen we voor deze doelstelling: 9 (proefdieren per groep) $\times 3$ (verschillende zuurstofbehandelingen) $\times 4$ (verschillende combinaties bestraling / TH-302 toediening) = **108 proefdieren**. Daarnaast vragen we ook: 9 (proefdieren per groep) $\times 2$ (verschillende bestralingsdosis 4 en 12 Gray) $\times 2$ (met en zonder TH-302) = **36**

In deze doelstelling worden in totaal dus $108 + 36 = 144$ proefdieren aangevraagd

Doelstelling 3: Effect TH-302 op hypoxische fractie

In deze doelstelling kijken we naar het effect van TH-302 al dan niet gecombineerd met bestraling op de hypoxische fractie in de tumor. Uitgaand van een beoogd verschil van 25%, een variabiliteit van 18%, een power van 80% (uitleesparameter: effect op hypoxische fractie onmiddellijk na behandeling) en een uitvalspercentage van 10% vragen we per groep 9 proefdieren.

Bestraling (8Gy)	TH-302 (dosis doelstelling 1)
-	-
-	+
+	-
+	+

In deze doelstelling vragen we dus: 9 (aantal proefdieren per groep) x 4 (behandelingen) = **36 proefdieren**.

In totaal vragen we voor deze studie: $36 + 144 + 36 = 216$ WAG/Rij ratten aan.

5 Dierproef

8. Experiment

Algemeen:

Alle experimenten beschreven in dit onderzoek gebeuren rekening houdende met de code of practise met betrekking tot dierproeven binnen kankeronderzoek (4). Eveneens werden de humane eindpunten op basis van dit document beargumenteerd.

1 mm³ rhabdomyosarcoma R1 tumor stukjes worden subcutaan getransplanteerd in de flank regio. Deze zijn op voorhand gescreend op rat pathogenen (goedgekeurd QM diagnostics K11-7216). Metastasering van de tumoren is zowel uit eigen ervaring als uit de literatuur erg onaannemelijk, sinds deze observatie nog nooit werd gemaakt.

Tijdens het experiment worden de subcutaan geïmplanteerde tumoren, wanneer voelbaar, 3x/week gemeten onder fixatie van het proefdier. De grootte van de tumor wordt bepaald gebruik makende van een Vernier calliper, in 3 orthogonale tumor diameters A, B en C, elk gecorrigeerd voor de huiddikte (1 mm). Het tumorvolume wordt dan berekend door gebruik te maken van de formule $A \times B \times C \times \pi/6$, omdat de tumoren elliptisch groeien.

Doelstelling 1: Bepalen optimale dosering

Het doel van deze experimenten is het bekomen van een TH-302 dosering die een intermediair groeivertragend effect veroorzaakt op de tumor, zonder toxiciteit. Wanneer een tumor volume van 3 tot 5 cm³ wordt bereikt, wordt 4 dagen op rij TH-302 geïnjecteerd via een intraperitoneaal injectie. Om te bepalen welke dosis de beste groeivertraging geeft worden 3 verschillende dosissen (25, 50 en 75 mg/kg) en een controle (0.9% NaCl) geïnjecteerd in verschillende groepen ratten. De dosis die wordt gegeven moet een groeivertraging geven, maar deze moet niet te groot zijn omdat we anders in de volgende doelstellingen het extra effect van bestraling niet meer kunnen detecteren. Vlak voor de eerste TH-302 injectie, de dag na de laatste injectie en 5 dagen daarna zal bloed worden afgenomen, door middel van een Saphena punctie (minimal 300µl, max 500 µl bloed), om eventuele toxiciteit te kunnen bepalen aan de hand van het aantal neutrofielen en witte bloedcellen. Verder wordt het lichaamsgewicht vanaf de eerste TH-302 injectie gedurende 2 weken dagelijks gemeten, daarna zal dit 3x per week worden gedaan. Het tumor volume zal gedurende het hele experiment 3x per week worden gemeten totdat 4x het volume van de start van de behandeling bereikt wordt. De maximale duur van deze experimenten is 6 maanden en is afhankelijk van de tumor groei.

Doelstelling 2: Predictie van behandelingseffect door middel van hypoxie bepaling

In deze doelstelling willen we de hoeveelheid hypoxie bepalen voor behandeling en nagaan of we aan de hand daarvan het effect van de behandeling kunnen bepalen. Het experiment begint zodra de tumoren een volume van 3 tot 5 cm³ hebben bereikt. De proefdieren worden dan opgedeeld in 3 groepen die elk een andere voorbehandeling (= dag 0) krijgen:

Groep 1 wordt gehandeld onder normale zuurstof (20%) condities

Groep 2 krijgt een behandeling met nicotinamide (500 mg/kg ip) gecombineerd met carbogeen ademen (95% zuurstof met 5% koolzuur) voor 2.5 uur waardoor de zuurstofconcentratie in de tumor toeneemt en de mate van hypoxie wordt verlaagd

Groep 3 wordt blootgesteld aan 7% zuurstof (aangevuld met stikstof) ademen (2.5 l/min) gedurende 2.5 uur waardoor de hypoxische fractie in de tumor zal toenemen.

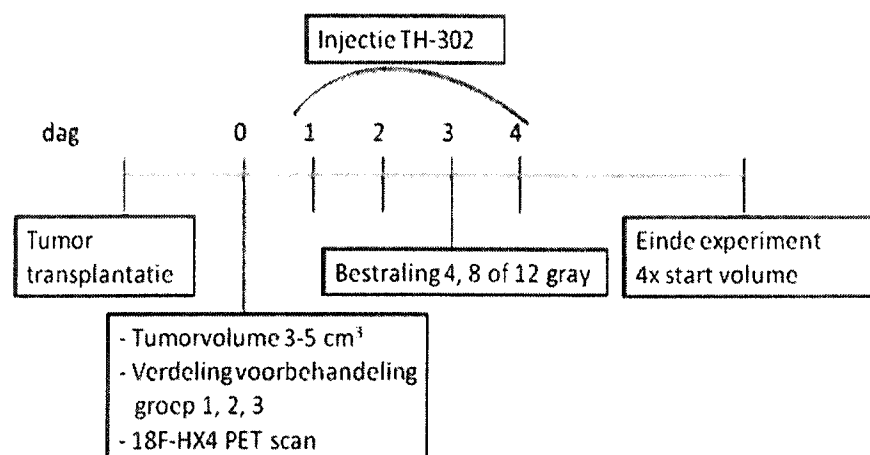
Van iedere groep wordt op dag 0 ook een 18F-HX4 PET/CT scan gemaakt om te bepalen wat de hypoxische fractie in de tumor is. Op dag 1, 2, 3 en 4 worden de proefdieren weer blootgesteld aan de voorbehandeling gevolgd door een injectie met TH-302 (dosering doelstelling 1). De dosis die wordt gebruikt is afhankelijk van het resultaat van doelstelling 1. Op dag 3 na de voorbehandeling en TH-302 injectie worden de ratten bestraald met een dosis van 8 Gray. Bestraling zal zo gebeuren dat alleen de tumor wordt blootgesteld aan de straling. Een mal van lood zorgt ervoor dat de rest van het dier geen straling krijgt.

Binnen elke groep met verschillende voorbehandeling worden ook controles meegenomen waarbij de proefdieren wel voorbehandeling en TH-302 injectie krijgen maar niet worden bestraald of waarbij ze wel voorbehandeling krijgen maar enkel worden bestraald zonder TH-302 injecties.

Daarnaast willen we in deze doelstelling onderzoeken of er een verband bestaat tussen de bestralingsdosis en het effect van de combinatie behandeling. Hiervoor willen we vier verschillende dosissen (0, 4, 8 en 12 gray) met elkaar vergelijken zonder voorbehandeling (normale zuurstof condities (20%)). Door dit in deze doelstelling te onderzoeken kunnen de resultaten van dieren die worden bestraald met 0 en 8 gray worden vergeleken met zowel de verschillende voorbehandelingen (groep 2 en 3) als met de verschillende bestralingsdosissen (4 en 12 gray). Het aantal proefdieren dat nodig is voor het onderzoek zal op deze manier worden gereduceerd.

Het tumor volume zal gedurende het hele experiment 3x per week worden gemeten totdat 4x het volume van de start van de behandeling bereikt wordt. Het lichaamsgewicht wordt vanaf de eerste TH-302 injectie gedurende 2 weken dagelijks gemeten, daarna zal dit 3x per week worden gedaan. De maximale duur van deze experimenten is 6 maanden en is afhankelijk van de tumor groei.

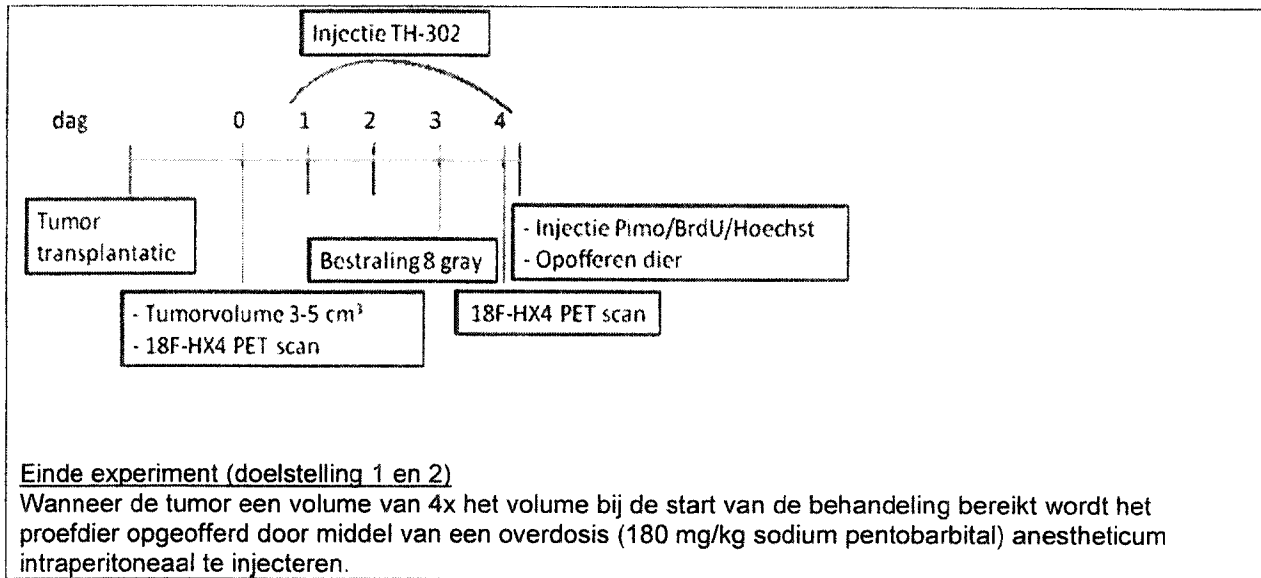
Een overzicht van de groepen is weergegeven bij onderdeel 7c. Een tijdlijn met alle behandelingen staat hieronder schematisch weergegeven.



Doelstelling 3: Effect TH-302 op hypoxische fractie

In deze doelstelling willen we zowel voor als na de behandeling met TH-302 de hypoxische fractie bepalen. Bij een tumorvolume van 3 tot 5 cm³ wordt een eerste 18F-HX4 scan gemaakt. Vervolgens wordt een TH-302 behandeling van 4 dagen gestart (gelijkaardig als in doelstelling 2) al dan niet met 8 Gray bestraling op de derde dag. Na de laatste behandeling op dag 4 wordt weer een 18F-HX4 PET scan gemaakt voor alle groepen (zie 7c) en de hoeveelheid hypoxie wordt vergeleken met deze van een controle (NaCl 0.9%) behandelde groep, waarna de proefdieren worden opgeofferd (zie schematisch overzicht). Een uur voor opoffering worden een hypoxia marker (pimonidazole 60 mg/kg) en een proliferatie marker (BrdU 30 mg/kg) intraperitoneaal geïnjecteerd. Een minuut voor opoffering, wanneer de dieren al onder algehele anaesthesie zijn (100 mg/kg + 15 mg/kg ketamine/xylazine mix) wordt een perfusie marker (15 mg/kg) i.v. geïnjecteerd. Nadat de tumor is verwijderd zal euthanasie gebeuren door een overdosis (180 mg/kg sodium pentobarbital) anestheticum intracardiaal te injecteren.

Het tumor volume zal gedurende het hele experiment 3x per week worden gemeten. Het lichaamsgewicht wordt vanaf de eerste TH-302 injectie dagelijks gemeten. De maximale duur van deze experimenten is 2 maanden en is afhankelijk van de tumorgroei.



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie tijdens bestraling en PET scan wordt uitgevoerd door middel van 100 mg/kg + 15 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie) intraperitoneaal toegediend. Isofluraan inhalatie (inductie: 4%, onderhoud: 1-2%) wordt gebruikt bij tumorimplantatie. Tijdens de anesthesie wordt oogzalf aangebracht om ter voorkomen van het uitdrogen van de ogen.

9b. Pijnbestrijding

De ratten ontvangen de tumor stukjes via een subcutane incisie onder isofluraan inhalatie. Voor de implantatie van de tumorstukjes, zullen we preoperatieve pijnbestrijding uitvoeren mbv buprenorfine (0,1 mg/kg subcutaan).

Beeldvorming en bestraling op zich veroorzaken geen significante pijn.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De ratten worden ge-euthanaseerd door overdosis anestheticum bij ziekte en wanneer de maximaal toegestane tumorlast wordt bereikt (25 cm³). Dit gebeurt door 3 x 60 mg/kg lichaamsgewicht sodium pentobarbital intraperitoneaal/intracardiaal te injecteren, aangezien cervicale dislocatie niet wordt aangeraden bij ratten > 150 g (4, 5).
- Humane eindpunten waarbij euthanasie gebeurd zijn ziekte (vast te stellen door onderzoeker, proefdierversorger), sterke vermagering (> 20%/dag) en wanneer de maximaal toegestane tumorlast (25 cm³) wordt bereikt.
- Wanneer er open wonden bij sterk extern necrotiserende tumoren zijn en wanneer er vocht lekt uit deze open wonde, wordt het proefdier onmiddellijk ge-euthanaseerd.

10a. Ongerief



Gering	= 01
Gering/matig	= 02
Matig	= 03
matig/ernstig	= 04
Ernstig	= 05
Zeer ernstig	= 06

Tumorimplantatie (matig = 03, gedurende 1 week, eenmalig, alle doelstellingen): Onder isofluraan anesthesie worden tumorstukjes subcutaan geïmplant. Preoperatieve pijnbestrijding wordt toegepast.

Tumorgroei (gering = 01, gedurende max 6 maanden, alle doelstellingen): Door de beperkte tumorload zijn geen systemische klachten te verwachten.

Tumorgrootte meting (matig = 03, 3x/week gedurende hele experiment, alle doelstellingen): De tumor zal herhaaldelijk onder fixatie gemeten worden. Het meten op zich zal zeer gering ongerief teweeg brengen, maar het herhaaldelijk fixeren veroorzaakt het aangegeven ongerief.

Afname bloed (matig = 03, 3x doelstelling 1)

Onder isofluraan anesthesie zal door middel van Saphena punctie 300 tot 500 microliter bloed worden afgenomen om het welzijn van het dier te monitoren.

Beeldvorming (gering/matig = 03): Onder ketamine/xylazine (100 mg/kg + 15 mg/kg ip) anesthesie wordt het dier in het toestel gepositioneerd.

Doelstelling 2: 1 acquisitie van 20 minuten

Doelstelling 3: 2 acquisities van 20 minuten (eerste op dag 0, tweede op dag 3)

Doelstelling 4: 1 acquisitie van 20 minuten

Toedienen TH-302 (matig = 03, 4x in iedere doelstelling). TH-302 wordt 4 dagen op rij toegediend via een intraperitoneaal injectie. De optimale dosis die het gewenste tumor groei vertragend effect heeft, wordt in doelstelling 1 bepaald en is maximaal 75mg/kg. Naar verwachting veroorzaakt het injecteren van TH-302 een ongerief van 02 (gering/matig), omdat wij 4 opeenvolgende dagen injecteren verhogen we de ongeriefscore naar 03 (matig).

Toedienen nicotinamide (matig = 03, 5x bij doelstelling 2): Nicotinamide wordt intraperitoneaal (500 mg/kg) toegediend en wordt geacht perfusie-gelimiterde hypoxie op te heffen (door te zorgen voor een verbeterde bloedvoorziening). Op zich veroorzaakt een eenmalige injectie van nicotinamide een ongerief van 02 (gering/matig) maar door 5 dagen op rij een injectie te geven verhogen we het ongerief naar 03 (matig).

Carbogeneen beademing (gering/matig = 02, 5x bij doelstelling 2): Carbogeen is een mengsel van 95% zuurstof en 5% koolstof dioxide wat chronisch hypoxie tegenwerkt, en veroorzaakt geen expliciet ongerief. Echter omdat het proefdier 5 dagen op rij wordt blootgesteld aan carbogeen beademing verhogen wij het ongerief naar 02 (gering/matig).

7% zuurstof beademing (matig = 03, 5x bij doelstelling 2): Door het ademen van gereduceerde hoeveelheid zuurstof kan het proefdier ofwel sneller gaan ademen ofwel dieper gaan ademen. Het ongerief dat wordt veroorzaakt is bij eenmalige blootstelling 02 (gering/matig) maar omdat de blootstelling 5 dagen op rij gebeurt verhogen wij de ongeriefscore naar 03 (matig).

Bestraling van de tumor (matig = 03, eenmalig bij doelstelling 2, 3 en 4): Onder anesthesie (ketamine/xylazine) wordt het dier in de mal (afscherming) en het toestel gepositioneerd. Bestraling op zich veroorzaakt gering ongerief, maar het bijkomen uit de anaesthesie brengt ongerief teweeg.

Injectie pimonidazole/BrdU (gering/matig = 02, 1x bij doelstelling 3)

Een uur voor het euthanaseren van de dieren wordt door middel van een i.p. injectie pimonidazole (60 mg/kg) en BrdU (30 mg/kg) toegediend.

Injectie (matig = 03, 1x bij doelstelling 3)

1 minuut voor euthanaseren, wanneer het dier nog onder algehele anesthesie is, wordt door middel van een i.v. injectie 33342 (15 mg/kg) toegediend.

Chirurgisch verwijderen van de tumor (gering/matig = 02 doelstelling 3): de tumoren worden onder gehele anesthesie verwijderd, waarna het dier ge-euthanaseerd wordt.

In onderstaand schema zijn alle handelingen met hun ongeriefscore, duur en frequentie per doelstelling weergegeven.

Doelstelling 1

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Tumorimplantatie	03 matig	1 week	Eenmalig
Tumorgroei	01 gering	Max 6 maanden	continu
Tumor grootte meting	03 matig	Gedurende hele experiment	3x / week
Afname bloed	03 matig		3x
Toedienen TH-302	03 matig		4x
Totaal ongerief	03 matig		

Doelstelling 2

Groep 1

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Tumorimplantatie	03 matig	1 week	Eenmalig
Tumorgroei	01 gering	Max 6 maanden	continu
Tumor grootte meting	03 matig	Gedurende hele experiment	3x / week
Beeldvorming	03 matig	20 minuten acquisitie	1x
Toedienen TH-302	03 matig	Ip injectie	4x
Bestraling van de tumor	03 matig		1x
Totaal ongerief	04 matig / ernstig		

Groep 2

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Tumorimplantatie	03 matig	1 week	Eenmalig
Tumorgroei	01 gering	Max 6 maanden	continu
Tumor grootte meting	03 matig	Gedurende hele experiment	3x / week
Beeldvorming	03 matig	20 minuten acquisitie	1x
Toedienen TH-302	03 matig	Ip injectie	4x
Toedienen nicotinamide	03 matig	Ip injectie	5x
Carbogene beademing	03 gering / matig		5x
Bestraling van de tumor	03 matig		1x
Totaal ongerief	04 matig / ernstig		

Groep 3

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
Tumorimplantatie	03 matig	1 week	Eenmalig
Tumorgroei	01 gering	Max 6 maanden	continu
Tumor grootte meting	03 matig	Gedurende hele experiment	3x / week
Beeldvorming	03 matig	20 minuten acquisitie	1x
Toedienen TH-302	03 matig	Ip injectie	4x
7% zuurstof beademing	03 matig		5x
Bestraling van de tumor	03 matig		1x
Totaal ongerief	04 matig / ernstig		

Doelstelling 3

Aard	Ernst	Duur	Frequentie
------	-------	------	------------

Tumorimplantatie	03 matig	1 week	Eenmalig
Tumorgroei	01 gering	Max 6 maanden	continu
Tumor grootte meting	03 matig	Gedurende hele experiment	3x / week
Beeldvorming	03 matig	20 minuten acquisitie	2x
Toedienen TH-302	03 matig		4x
Bestraling van de tumor	03 matig		1x
Injectie pimonidazole/BrdU	03 gering / matig	Ip injectie	1x
Injectie	03 matig	Iv injectie	1x
Chirurgische verwijdering tumor	02 gering / matig		1x
Totaal ongerief	04 matig / ernstig		

10b. Welzijnsevaluatie

Een welzijnsevaluatie (ongerieflogboek) wordt bijgehouden.

11. Verzorging en huisvesting

Zowel de diervverzorgers van het CPV als de onderzoekers verzorgen de dieren. Op deze wijze is het toezicht op en het welzijn van de dieren gewaarborgd. WAG/rij ratten worden gehuisvest in de experimentele afdeling, in groepen van max 3. Na injectie met radioactief fluor-18 HX4 worden de ratten tijdelijk op geplaatst tot verval. Hierna zullen de ratten worden terug geplaatst op experimentele afdeling. Water en voedsel worden verstrekt ad libitum. Kooien worden volgens de standaardregels onderhouden. In het geval van calamiteiten contact opnemen met VO () of VVO ().

12. Deskundigheid

De experimenten zullen hoofdzakelijk worden uitgevoerd door een art. 9 met ruim een jaar ervaring. Verdere zullen een art 9 en een art 12 meehelpen aan het experiment, beide met ruim voldoende ervaring (meer dan 5 of 6 jaar).

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Implantatie van tumor stukjes rat:

Na het verdoven van het proefdier met isofluraan (inductie: 4%, onderhoud: 1-2%) wordt onder aseptische omstandigheden een cutane incisie gemaakt op de laterale flank 2 cm boven de achterpoot. De incisie heeft een geplande lengte van 8 mm. Vervolgens wordt met een prepareerschaar een oppervlakte van ongeveer 1,5 cm² subcutaan vrijgemaakt, waarna een stukje tumorweefsel (Rhabdomyosarcoma R1) van ongeveer 1 mm³ wordt ingebracht. De cutis wordt met een niet oplosbare hechting (Perma-hand seide 5-0 Rb-1 plus, needle length 17mm 1/2c, suture length 75 cm van Ethicon) gesloten. Voor de implantatie van de tumorstukjes, zullen we preoperatieve pijnbestrijding uitvoeren mbv buprenorfine (0,1 mg/kg subcutaan). De tumor stukjes zijn ter beschikking gesteld aan de bevoegde instanties in verband met microbiologische screening en negatief gevonden voor rat pathogenen (K11-7216). Wanneer de tumoren voelbaar aanwezig zijn, worden de tumoren opgemeten met een Vernier calliper.

Verwijderen tumoren (na beeldvorming):

De ratten worden geanestheseerd met 100 mg/kg + 15 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie) intraperitoneaal om beeldvorming uit te voeren. Op het einde van het experiment worden de tumoren verwijderd en een onmiddellijk overgebracht in vloeibare stikstof en zullen bij -80°C worden bewaard voor verdere analyse. Na afloop worden de dieren ge-euthanaseerd door middel van overdosis anestheticum. Dit gebeurt door 180 mg/kg lichaamsgewicht sodium pentobarbital intraperitoneaal te injecteren, aangezien cervicale dislocatie niet wordt aangeraden bij ratten > 150 g.

PET/CT beeldvorming:

De ratten worden geanestheseerd met 100 mg/kg + 15 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie) intraperitoneaal om beeldvorming uit te voeren. De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via

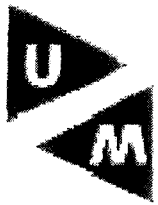
testen van de ooglid- en teenreflex. Het dier wordt gepositioneerd in een polystyreen module in het centrum van de detecterring voor optimale beeldvorming. Tijdens de anesthesie wordt oogzalf aangebracht om ter voorkomen van het uitdrogen van de ogen. Injectie met ¹⁸F-HX4 zal worden gedaan via een catheter geplaatst in de staartvene. Deze zal worden geflushed met heparine om bloedklontering te voorkomen.

Tumor bestraling:

Wanneer beschreven zullen tumoren bestraald worden met een enkele dosis van 4, 8 of 12 Gy. Dit zal gebeuren binnen het . Hierbij wordt alleen de tumor blootgesteld aan de bestraling, de rest van de rat zal worden afgeschermd en vrijgesteld van straling.

Relevante literatuur

- 1) Dubois et al 2004, BJC 91(11):1947-54
- 2) Brown JM & Giaccia AJ (1998), Cancer Res 58(7):1408-1416.
- 3) Tatum JL, et al. (2006), Int J Radiat Biol 82(10):699-757
- 4) Code of Practice: dierproeven in het kankeronderzoek. Inspectie W&V.
- 5) Close et al (1997), Lab Anim 31: 1-31



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, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Hypoxie beeldvorming en therapeutisch effect van TH-302 met bestraling*", is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Punt 8. De DEC is van mening dat de proef onder doelstelling 2 (8 Gy) en 4 (4 en 12 Gy) in dezelfde periode uitgevoerd moeten worden (zodat data onderling vergelijkbaar zijn).
- Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst om te zetten in een tabel waarin de aard, ernst, duur en frequentie van de individuele handelingen **per** groep weergegeven wordt, en te sommeren tot een totaal ongerief per groep. De DEC denkt dat het totale ongerief code 04 is (eventueel ook op het voorblad aanpassen).

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 2011-114, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

Secretariaat CPV-UM

Maastricht, September, 2011.

Betreft: project 2011-114 opmerkingen

Geachte voorzitter DEC,

Naar aanleiding van uw opmerkingen op de projectaanvraag 2011-114 "*Hypoxie beeldvorming en therapeutisch effect van TH-302 met bestraling*" wil ik volgende antwoorden formuleren.

- * Punt 8. De DEC is van mening dat de proef onder doelstelling 2 (8 Gy) en 4 (4 en 12 Gy) in dezelfde periode uitgevoerd moeten worden (zodat data onderling vergelijkbaar zijn).

Doelstelling 2 en 4 zijn samengevoegd in het DEC aanvraag formulier en de experimenten zullen dus in dezelfde periode worden uitgevoerd waardoor de data onderling vergelijkbaar zullen zijn.

- * Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst om te zetten in een tabel waarin de aard, ernst, duur en frequentie van de individuele handelingen **per** groep weergegeven wordt, en te sommeren tot een totaal ongerief per groep. De DEC denkt dat het totale ongerief code 04 is (eventueel ook op het voorblad aanpassen).

De tabel is ingevoegd in de DEC aanvraag en de ongeriefscore bij doelstelling 2 en 3 zijn aangepast naar 04 matig /ernstig.

Met vriendelijke groet,

From: ..
Sent: dinsdag 6 september 2011 14:59
To: Dec Secretariaat
Subject: RE: definitieve DEC aanvraag

Beste

Bij punt 8 heb ik inderdaad geschreven dat het aantal dieren wordt gereduceerd. In de eerste DEC aanvraag hebben we ratten gevraagd voor doelstelling 2 en voor doelstelling 4. In doelstelling 4 gebruiken we echter een aantal controles en experiment groepen die we in doelstelling 2 al zouden hebben uitgevoerd. Op deze manier reduceren we het aantal dieren. De DEC commissie heeft gevraagd doelstelling 4 samen uit te voeren met doelstelling 2 zodat alles beter vergelijkbaar is.

In de aangepaste DEC aanvraag heb ik doelstelling 2 en 4 dus samengevoegd. Maar het aantal dieren dat we aanvragen in de aangepaste aanvraag blijft gelijk aan het aantal in de eerste DEC aanvraag:

doelstelling 1: 36

doelstelling 2: 144 (eerste DEC aanvraag 108 voor doelstelling 2 en 36 voor doelstelling 4)

doelstelling 3: 36

Samen blijven dit 216 dieren.

Maar het was inderdaad duidelijker geweest als ik in de aangepaste aanvraag weg had gelaten dat we op deze manier (door controles dubbel te gebruiken) het aantal dieren kunnen reduceren.

Hopelijk is het zo duidelijk, anders hoor ik het graag.

Met vriendelijke groet,

From: Dec Secretariaat
Sent: Tuesday, September 06, 2011 09:02
To:
Subject: FW: definitieve DEC aanvraag

Dag

Ik heb je herziene versie bekeken en heb een vraag:

Je geeft in de tekst bij punt 8 (grijs gemarkeerde deel) aan, dat het aantal proefdieren gereduceerd zal worden.

Ik kom op het voorblad echter uit op hetzelfde aantal dieren, 216, als in de originele aanvraag. Zover ik bij punt 7c kan zien zou, volgens mij, het totaal aantal 144 + 36 moeten zijn of zie ik dit verkeerd?

Ik ben maar een leek, dus misschien heb ik het fout, maar zou je er nog eens opnieuw naar willen kijken.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

E-mail:

Werktijden:

6-9-2011

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
08-09-2011*Project: Hypoxie beeldvorming en therapeutisch effect van TH-302 met bestraling.*DEC-UM
Voorzitter DEC-UM*Verantwoordelijk onderzoeker (VO):*

p/a secretariaat DEC-UM

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:** 2011-114**Diersoort:** rat**Aantal dieren:** 216**Einddatum:** 07-09-2015

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