

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Nieuw**DECNR: 2011-111****Ontvangen: 29-07-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
26-08-2011	Pilot

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

Deelproject				MaastRO			
-------------	--	--	--	---------	--	--	--

Financieel beheerder

Budgetnummer	3094 3116 B
--------------	-------------

Titel van het onderzoek:

"Straling geïnduceerde long toxiciteit: tweede optimalisatie SSmART (Smart Small Animal Radiation Therapy) toestel"

startdatum 01/10/2011

einddatum ⁹ 01/10/2012Duur van de proef¹⁰:**24 uur**

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.12	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				
4. overige uitvoerenden			Art. 9	
5.				

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	Pilot						
Diersoort	01						
Stam	C57/Bl6						
Construct / mutatie ?	-						
Herkomst (leverancier) *	02						
Aantal	6						
Geslacht	m						
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	11 wk						
Doel van de proef *	30						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	01						
Anesthesie *	04						
Pijnbestrijding *	01						
Mate ongerief *	03						
Toestand dier einde exp*	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: "Straling geïnduceerde long toxiciteit: tweede optimalisatie SSmART (Smart Small Animal Radiation Therapy) toestel"

1. Doel van de proef.

Kanker is een van de grootste doodsoorzaken wereldwijd en longkanker is een van de meest voorkomende vormen. Meer dan 60% van de long kanker patiënten wordt behandeld met bestraling (1). Het is aangetoond dat een verbetering van de lokale tumor controle aanleiding geeft tot een verhoogde overleving (2). In dagelijkse klinische praktijk is het daarom nu algemeen aanvaard om de hoogst mogelijke dosis te leveren. Tegelijkertijd is de long ook het meest dosis limiterende orgaan omwille van de toxische nevenwerkingen zoals hoesten, apneu/dyspneu en radiopneumonitis.

Het doel van dit onderzoek is het begrijpen van deze toxische nevenwerkingen geïnduceerd door een gezonde long om uiteindelijk de therapeutische ratio van long kanker behandeling te verbeteren (meer dosis op de tumor door tegelijkertijd de toxische nevenwerkingen op de gezonde long te verlagen).

Recent werd bij een kleine proefdier bestralingstoestel (SSmART: Smart Small Animal Radiation Therapy) geïntroduceerd, waarbij we met behulp van een in het toestel aanwezig Cone Beam CT submillimeter dosis kunnen geven op organen, tumoren, ... Dit toestel willen ook gebruiken in bovenstaande doelstelling. In een eerste pilot-experiment (DEC 2010-174) zijn we nagegaan of de bestraling effectief aankomt waar deze werd ingetekend op basis van de CT beeldjes. Ondanks een intekening op de bovenste rechter long helft, bleek er een afwijking te zitten op het effectief bestraalde gedeelte.

Met behulp van deze tweede pilot-experiment willen we dit toestel verder optimaliseren, zodat in volgend onderzoek op een gestandaardiseerde en correcte manier kunnen bestralen. Dit wil zeggen, als we op CT beeldjes een orgaan/tumor intekenen, dit ook effectief bestraald wordt met de ingestelde dosis, rekening houdende met de bewegingen (ademhaling, hartslag) van het proefdier.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Het is essentieel om de behandeling tegen kanker te verbeteren, zonder daarbij de toxische nevenwerkingen te verhogen. Door het begrijpen van deze nevenwerkingen, kunnen we deze verminderen met specifieke daarop gerichte behandeling om uiteindelijk hogere bestralingsdosissen uit te oefenen op de tumor zodat de kans op overleving verder verhoogd. Het begrijpen van deze nevenwerkingen is daarom een eerste stap in de deze richting. Het onderzoek wordt uitgevoerd op proefdieren enerzijds omdat we niet gemakkelijk normaal longweefsel van de patiënt kunnen bekomen en anderzijds omdat we met behulp van de SSmART behaalde onderzoeksresultaten gemakkelijk kunnen extrapoleren naar de patiënt.

3. Alternatieven

Aangezien we het proces van stralingsgeïnduceerde long toxiciteit willen begrijpen is het belangrijk om dit in een fysiologisch complex systeem uit te voeren, waarbij rekening gehouden wordt met zuurstof aanvoer, doorbloeding, 3D-structuren, ... Dit zijn condities die in vitro niet mogelijk zijn en dienen deze experimenten ook in vivo uitgevoerd te worden. Het optimaliseren van deze bestralingstechnieken zal aanleiding geven tot een reductie van het aantal proefdieren tijdens volgende experimenten.

4. Ethische afweging

Kanker is een van de grootste doodsoorzaken in Nederland en de uiteindelijke dosis die een patiënt kan krijgen is afhankelijk van de toxische nevenwerkingen. Het bestuderen van stralingsgeïnduceerde long toxiciteit zal nieuwe inzichten geven en wanneer we hierop kunnen inwerken, zal dit ook bijdragen aan de overleving.

Tijdens de gehele studie zal gestreefd worden naar een zo laag mogelijk ongerief en minimalisering van pijn en lijden. Het ongerief voor de proefdieren weegt ons inziens op tegen het belang van de proeven.

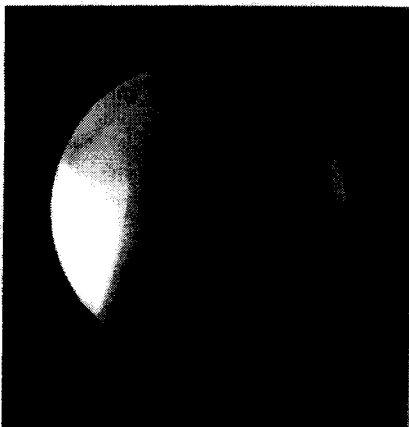
2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Kanker is een van de grootste doodsoorzaken wereldwijd en longkanker is een van de meest voorkomende vormen. Meer dan 60% van de long kanker patiënten wordt behandeld met bestraling (1). Het is aangetoond dat een verbetering van de lokale tumor controle aanleiding geeft tot een verhoogde overleving (2). Ongeveer 2/3 van de winst in lokale tumor controle wordt vertaald in een overlevingsvoordeel. Een dosis-escalatie studie in de VS heeft aangetoond in NSCLC patiënten dat een toename van dosis met 1 Gy bovenop 66 Gy, resulteert in een 1% toename in 3 en 5 jaar overleving (3). Daarom is het ook belangrijk om een zo hoog mogelijke dosis te hanteren.

Dit plafond wordt echter bepaald door dosis limiterende organen, zoals long, grote vaten, ... die tevens in het bestralingsveld aanwezig zijn. Dit leidt tot nevenwerkingen zoals hoesten, apneu/dyspneu, radiopneumonitis en fibrose. Het klinisch verschijnen van deze symptomen gebeurt in verschillende fases tijdens en na de bestraling en is afhankelijk van de toegediende dosis. Verder is ook aangetoond dat niet alle delen van de long even gevoelig zijn aan bestraling. Zo hebben onderzoekers gemerkt dat bestralen van de long basis leidt tot meer toxiciteit dan het bestralen van de long apex (4).

Recent werd bij een kleine proefdier bestralingstoestel (SSmART: Smart Small Animal Radiation Therapy) geïntroduceerd. Dit toestel heeft een Cone Beam CT on board, zodat we met behulp van CT beeldvorming tot op submillimeter niveau een dosis kunnen geven op organen, tumoren, ... Dit toestel willen ook gebruiken in bovenstaande doelstelling. In een eerste pilot-experiment (DEC 2010-174) hebben we met behulp van EPID dosimetry analyses kunnen aantonen dat de ingetekende dosis (bovenste helft rechter long) op het micro-CT beeldje (= treatment planning) niet overeenkomt met de werkelijk afgeleverde dosis (rood). De werkelijke dosis bleek anatomisch gezien lager te liggen en meer centraal (deels op de wervelkolom), wat op langere termijn (volgende studies) kan leiden tot verhoogde normaal weefsel toxiciteit.



In tussentijd is de treatment planning verder geoptimaliseerd en is de shift naar onder - centraal verholpen. Met behulp van deze tweede pilot-experiment willen we het toestel verder optimaliseren, zodat in volgend onderzoek op een gestandaardiseerde en correcte manier kunnen bestralen. Dit wil zeggen, als we op CT beeldjes een orgaan/tumor intekenen, dit ook effectief bestraald wordt met de ingestelde dosis, rekening houdende met de bewegingen (ademhaling, hartslag) van het proefdier. Het effect van bestraling wordt daarom ex vivo gecontroleerd met behulp van DNA schade kleuringen (γ -H2AX).

Figuur: gefuseerd beeldje van een scout cone-beam micro-CT voor bestraling waarop het gebied wordt afgetekend om dosis te leveren met de lokatie van de EPID dosimetry (rood) tijdens/na bestraling. Een duidelijke mismatch tussen beide is zichtbaar.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit specifieke DEC protocol is beoordeeld en akkoord bevonden door het hoofd van het laboratorium (1), het hoofd van (2) en (3).

De principal investigator van dit project is de financieel beheerder van de huidige aanvraag (zie voorblad).

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor dit experiment willen we gebruik maken van C57/BL6 muizen.

We willen deze muizen gebruiken omdat we in volgende studies gebruik willen maken van SpC-TNF Tg (COPD muizen, fok onder beheer van : (5)) en WT transgene muizen in een C57/BL6 genetische achtergrond. De dieren zullen worden geleverd door de reguliere UM leveranciers (Charles River/ Harlan). Aan het einde van het experiment zullen de muizen worden gedood.

7b. Sexe

Mannelijk omdat aangetoond is dat de er een invloed bestaat van de geslachtshormonen of de inflammatoire reactie (wat we in volgende studies willen onderzoeken). Omdat mannetjes geen cycli vertonen in deze hormonen, verkiezen we nu ook om mannelijke proefdieren te gebruiken.

7.c. Aantallen

Aangezien dit een pilot-experiment betreft, vragen wij 6 muizen.

Dierproef

8. Experiment

Alle experimenten beschreven in dit onderzoek gebeuren rekening houdende met de code of practice met betrekking tot dierproeven binnen kankeronderzoek (6). Eveneens werden de humane eindpunten op basis van dit document beargumenteerd.

Muizen worden onder isofluraan anesthesie (inductie 4%, onderhoud 1 – 2%) gepositioneerd in de SSmART. Eerst wordt een CT opname gedaan ter hoogte van de thorax, waarbij de longen worden geïdentificeerd. Dit beeldje wordt dan gebruikt om de 2 bovenste lobben van de rechterlong (+/- 30% van de rechterlong) te bestralen met een dosis van 20 Gy, dit nog steeds onder isofluraan anesthesie. We verwachten dat de volledige procedure 30 minuten duurt (CT: 5 min; intekenen: 5 min; bestralen: 20 min).

24 uur na de bestraling worden de dieren onder algehele terminale anesthesie gebracht (sodiumpentobarbital 120 mg/kg intraperitoneaal), wordt er via een hartpunctie bloed verkregen. Daarna wordt het diafragma doorgeprikt. Na cervicale dislocatie wordt de borstholte opengemaakt en de longen/hart verwijderd en voorbehandeld voor histopathologische bevestiging.

Er is geen mogelijkheid om historische controles te gebruiken omdat deze experimenten nooit eerder op deze wijze zijn uitgevoerd.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie en euthanasie gebeuren in overeenstemming met het standaard protocol van het CPV van de Universiteit van Maastricht.

Tijdens de CT beeldvorming en bestraling zullen de muizen onder anesthesie zijn door middel van isofluraan inhalatie (inductie 4%, onderhoud 1-2%). Gedurende de anesthesie wordt oogzalf aangebracht ter voorkoming van uitdroging van de ogen. Vooraleer het proefdier ge-euthanaseerd wordt, wordt het dier onder algehele terminale anesthesie gebracht dmv Sodium Pentobarbital (120 mg/kg intraperitoneaal). Na hartpunctie en doorprikken van diafragma, wordt euthanasie uitgevoerd dmv cervicale dislocatie.

9b. Pijnbestrijding

Er wordt geen significante pijn verwacht.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De dieren worden uit experiment genomen 24 uur na bestraling en ge-euthanaseerd door middel van cervicale dislocatie
- Bij een gewichtsverlies van meer dan 15% op korte tijd of meer dan 20% ten opzichte van het start gewicht zal een dier worden ge-euthanaseerd.
- Euthanasie zal plaatsvinden wanneer een dier kortademigheid of respiratoire moeilijkheden vertoont.

Zorg

10a. Ongerief



Beeldvorming en bestraling (matig = 03): Onder isofluraan anesthesie wordt het dier in het toestel gepositioneerd. Beeldvorming en bestraling op zich veroorzaakt gering/matig ongerief, maar het bijkomen uit de anesthesie brengt ongerief teweeg.

Chirurgisch verwijderen van de longen/hart (gering/matig = 02): 24 uur na bestraling wordt een hartpunctie uitgevoerd en het diafragma doorgeprikt onder algehele terminale anesthesie. Na cervicale dislocatie worden de organen verwijderd, wat geen extra ongerief levert.

10b. Welzijnsevaluatie

Een welzijnsevaluatie (ongerieflogboek) wordt bijgehouden. Uit vorige pilot-experiment is gebleken dat een deel van de wervelkolom in het bestralingsveld lag, wat op langere termijn (bij volgende studies) kan leiden tot verhoogde toxiciteit.

11. Verzorging en huisvesting

Om het welzijn van de dieren te waarborgen zal de verzorging worden gedaan door zowel de diervverzorgers van het CPV als de onderzoekers. De muizen worden gehuisvest op experimentele afdeling, maximaal in groepen van 3. Water en voedsel wordt ad libitum verstrekt en kooien worden volgens de standaardregels onderhouden.

In geval van calamiteiten contact opnemen met de VO.

12. Deskundigheid

De experimenten zullen worden uitgevoerd door een art. 9 die reeds eerder actief heeft geparticipeerd in proefdier experimenten samen met een art 12, beiden met meer dan 5 jaar ervaring.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

CT beeldvorming en bestraling:

Sedatie met behulp van inhalatie anesthesie met isofluraan (inductie 4%; onderhoud: 1.0-2.0 %). Het anestheticum wordt toegediend via een mondkapje met behulp van een zuurstof/perslucht als dragergas. De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van de ooglid- en teenreflex. Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur (opvolging met anale probe) op peil gehouden door middel van een warmteplaat, waarop de muis gepositioneerd wordt. Het finale protocol zal beschreven worden na de pilot.

Verwijderen van organen na hartpunctie en doorprikken diafragma:

Zie SOP3

(7). Muizen worden verdoofd met sodium pentobarbital (120 mg/kg) intraperitoneaal. Vanaf het moment dat de muis verdoofd is, wordt de buik geschoen en de pootjes vastgekleefd op een tafel met plakband. De muis wordt opengeknipt en de linkerborstspier verwijderd. Tussen de 3^{de} en 4^{de} rib wordt mbv een 25G naald (2 ml spuit met 50 ul EDTA of heparine) hartpunctie uitgevoerd. Prik een gaatje in het diafragma, waardoor een non-functie van de longen optreedt. Na cervicale dislocatie kunnen organen vrijgeprepareerd worden.

Relevante literatuur

- (1) Kong FM, Ten Haken RK, Schipper MJ, Sullivan MA, Chen M, Lopez C, et al. High-dose radiation improved local tumor control and overall survival in patients with inoperable/ unresectable non-small-cell lung cancer: long term results of a radiation dose escalation study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63:324-333
- (2) van Baardwijk A, Wanders S, Boersma L, Borger J, Ollers M, Dingemans AM, Bootsma G, Geraedts W, Pitz C, Lunde R, Lambin P, De Ruyscher D. Mature results of an individualized radiation dose prescription study based on normal tissue constraints in stages I to III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:1380-6
- (3) Kocak Z, Borst GR, Zeng J, Zhou S, Hollis DR, Zhang J, et al. Prospective assessment of dosimetric/physiologic-based models for predicting radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;67:178-86
- (4) Liao ZX, Travis EL, Tucker SL. Damage and morbidity from pneumonitis after irradiation of partial volumes of mouse lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;32:1359-1370
- (5) Langen R et al, *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 35(6):689-96.
- (6) Inspectie W&V, Z.D.H. juli 1999. CODE OF PRACTICE, DIERPROEVEN IN HET KANKERONDERZOEK.
- (7) Vernooij JH, Dentener MA, van Suylen RJ, Buurman WA, Wouters EF. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells. No role for tumor necrosis factor-alpha and infiltrating neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24(5):569-576

Aan:]

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
30-08-2011

Project: *Straling geïnduceerde long toxiciteit: tweede optimalisatie
SSmART (Smart Small Animal Radiation Therapy) toestel.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM
1 (043)

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: 2011-111
Diersoort: muis
Aantal dieren: 6
Einddatum: 26-08-2015

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