

78

1

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-112

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				MaastrO			
-------------	--	--	--	---------	--	--	--

Financieel beheerder		Budgetnummer	3094 3116 B
----------------------	--	--------------	-------------

Titel van het onderzoek:

Microbubbles en Ultrasound om het effect van bestraling te verhogen

startdatum

1 oktober 2011

einddatum ⁹30 september
2015Duur van de proef¹⁰: 4 maanden

	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. overige uitvoerenden				Art. 9	
4. overige uitvoerenden				Art.12	

Diergroep	1	2					
ctrl/exp/sham	exp	exp					
Diersoort	01	01					
Stam	NMRI-nu	NRMI-nu					
Construct / mutatie ?	-	-					
Herkomst (leverancier) *	01	01					
Aantal	8	40					
Geslacht	m/v	m/v					
Dieren immuuncompetent ?	nee	nee					
Leeftijd/gewicht	2m/28-30g	2m/28-30g					
Doel van de proef *	30	30					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	03	04					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHL-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)
Titel: Microbubbles en Ultrasound om het effect van bestraling te verhogen

1. Doel van de proef.

Bestraling is een van de standaardtherapieën in de oncologie. De methoden en protocollen zijn echter nog niet volmaakt en ondanks grote technische en protocollaire verbeteringen is er nog steeds behoefte aan verdere verbeteringen van de techniek. Het verlagen van de bestralingsdosis om de toxiciteit voor normaal gezond weefsel te verlagen en het verhogen van de gevoeligheid van tumorcellen voor bestraling is het ultieme doel binnen bestralingstherapie. Hiervoor worden vele mogelijkheden onderzocht, o.a. medicatie die synergistisch met de bestraling de groei van tumorcellen remt, tot aan het verhogen van het zuurstofgehalte in de tumor door medicatie of toedienen van hoge concentratie zuurstof aan patiënten. Dit laatste is gebaseerd op het feit dat de vorming van zuurstofradicalen tijdens bestraling een van de sterkste werkingsmechanismen van radiotherapie is, en de observatie dat slecht doorbloede tumoren/tumorgedeelten met een laag zuurstofgehalte veel minder gevoelig zijn voor bestraling.

Recent werd in vitro aangetoond dat de gevoeligheid van leukemie cellen voor bestraling verhoogd kan worden door voorbehandeling met microbubbles and ultrasound (Karshafian, IEEE, 2009), waarschijnlijk op basis van een combinatie van extravasatie en sonoporië. Deze microbubbles worden normaal gebruikt bij ultrasound beeldvorming om het signaal te verhogen: de microbubbles worden ingespoten, circuleren in de bloedbaan, en weerkaatsen ultrageluid zeer sterk. Dit wordt gebruikt om doorbloeding van organen te onderzoeken en tumoren te vinden, omdat deze vaak een afwijkende doorbloeding hebben vergeleken met het omringende weefsel. Door akoestische activatie bij intensievere ultrasound settings kunnen deze microbubbles een therapeutisch effect of therapieverhogend effect hebben door het doorbreken van de endotheliale wand van de bloedbanen (extravasatie) en het maken van openingen in celmembranen (sonoporië). Dit kan leiden tot plaatselijke verhoogde opname van geneesmiddelen, zoals al is aangetoond in DEC2009-181 en 2010-065 met dezelfde apparatuur en microbubbles die in deze aanvraag gebruikt zullen worden. In het geval van bestraling zou een verhoogde doorbloeding van tumorweefsel voor een verhoging van het zuurstofgehalte kunnen zorgen en dus voor een beter effect van de bestraling in de ultrasound behandelde tumor.

Binnen deze aanvraag willen we uitzoeken of extravasatie en sonoporië inderdaad het therapeutisch effect van bestraling kan versterken in een klinisch relevant tumor model in proefdieren. De doelstellingen binnen deze aanvraag zijn:

1. Bewijs van extravasatie en sonoporië van ultrasound/microbubbles behandeling
2. Bewijs van een therapeutisch verhoogd effect van bestraling indien gecombineerd met ultrasound/microbubbles

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Kanker is (een van) de meest voorkomende doodsoorzaak ter wereld. Bestraling is een veel toegepaste behandeling tegen kanker. Ultrasound/microbubbles kan het effect van de bestraling versterken, waardoor de kans op een succesvolle behandeling groter wordt. Dit onderzoek kan een fundamentele bijdrage leveren aan het optimaliseren van de behandeling voor kankerpatiënten.

3. Alternatieven

Humane tumoren worden beïnvloed door het complexe organisme waarin ze groeien. De vorming van nieuwe vaten in de tumor, de daarmee gepaard gaande 3D structuur van de tumor wordt bepaald door het organisme waarin de tumor groeit. Het effect van de gecombineerde behandeling ligt waarschijnlijk in de verbetering van de doorbloeding van tumoren. De microbubbles worden via systemische circulatie tot in de tumor gebracht waar ze geactiveerd worden door ultrasound behandeling. Daarmee is een functioneel bloedvatensysteem essentieel voor het uitvoeren van deze experimenten, en is onderzoek in proefdieren noodzakelijk.

4. Ethische afweging.

Gemiddeld wordt er een ongerief score van 4 verwacht bij de verschillende groepen. Gedurende de hele studie wordt er gestreefd naar een zo laag mogelijk ongerief en minimalisering van pijn en lijden. De behandelingen die tijdens deze studie zal worden gebruikt, zijn niet invasief, maar de gevolgen van de behandeling die het dier ondergaat kan echter wel voor mogelijk ongerief zorgen. Het belang van dit onderzoek weegt, naar onze mening, echter meer aangezien dit soort onderzoek kan leiden tot een betere behandeling van de kankerpatiënt.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Naast het traditionele gebruik van ultrasound voor diagnostische imaging worden nieuwe toepassingen van ultrasound gevonden. In plaats van chirurgie kan men sinds recent gebruik maken van "High Intensity Focused Ultrasound" (HIFU) voor het verwijderen van weefsel (ablatie) doordat men heel precies hoge energie kan focussen op kleine volumes weefsel (Böhmer et al, EJCR 2009). Daarnaast kunnen microbubbles, kleine gasbelletjes omgeven door een mantel van vetten, eiwitten of polymeren, worden gebruikt als contrast stof in diagnostisch ultrasound. Voor therapie kunnen deze microbubbles gebruikt worden voor ultrasound geïnduceerde lokale drug delivery. Een onderscheid kan gemaakt worden tussen (1) gelijktijdig toedienen van geneesmiddelen en microbubbles ofwel (2) het vullen van de microbubbles met het geneesmiddel. In het eerste geval is de functie van de microbubbles het verhogen van de permeabiliteit van de bloedvaten door extravasatie (tijdelijke openingen tussen de cellen van het bloedvat en achterliggend weefsel) of door sonoporatie (tijdelijke openingen in de cellen van het bloedvat en achterliggend weefsel) geïnduceerd door ultrasound (Hernot en Klibanov, Adv Drug Deliv Rev 2008). In het tweede geval kan de microbubble gewijzigd worden om geneesmiddelen of DNA te bevatten, dat plaatselijk wordt vrijgegeven onder invloed van ultrasound. Het grootste voordeel hiervan is dat dit een kans biedt om de dosis te verlagen terwijl therapeutisch effect behouden blijft (Lentacker et al, J Contr Release 2006).

De tumor micro-omgeving beïnvloedt de groei van de tumor en zijn capaciteit om uit te zaaien. Verder beperkt het de opname van geneesmiddelen en kan het leiden tot het ontwikkelen van resistentie tegen deze geneesmiddelen. Het bloedvatenstelsel in een tumor is echter minder goed georganiseerd en veelal lekkend, wat leidt tot abnormaal functioneren van de bloedvaten. Dit leidt tot een verhoogde interstitiële druk en een verlaagde osmotische druk wat de opname van geneesmiddelen verhindert doordat de extravasatie vanuit het bloed naar de tumorcellen lager is. Bovendien is de zuurstof concentratie vaak verlaagd (hypoxie), hetgeen ook nog kan leiden tot een verhoogde productie van metabolieten (lactaat) en dus een lage extracellulaire pH, wat ook de werking van geneesmiddelen beïnvloedt (Böhmer et al, EJCR 2009). De hypoxie leidt ook tot het verlagen van het effect van bestraling aangezien er minder celdodende zuurstofradicalen gevormd kunnen worden in de tumor tijdens de bestraling.

De tumor micro-omgeving vormt echter voor het onderwerp van deze aanvraag een kans, aangezien de microbubbles onder toedoen van ultrasound de permeabiliteit van de bloedvaten kan verhogen (zie boven). Recent werd aangetoond dat de permeabiliteit van bloedvaten in MC38 tumoren kan worden verhoogd gedurende tenminste 1 uur (Böhmer et al, J Contr Release 2010). Anderzijds werd er ook aangetoond dat in vitro de gevoeligheid van leukemie cellen voor bestraling verhoogd kan worden door voorbehandeling met microbubbles and ultrasound (Karshafian, IEEE, 2009). Ook werd aangetoond dat de volgorde en tijd tussen de behandelingen een rol speelt in het bereikbare effect (Karshafian, IEEE, 2010). Echter, deze laatste studies op leukemie cellen waren in vitro testen op celculturen, waarbij de doorbloeding en zuurstofgehalte van de tumor geen rol spelen. Aangezien juist dit een zeer belangrijke factor is voor het slagen van bestraling is het van groot belang deze mogelijkheden in een in vivo model te testen.

Binnen deze aanvraag willen we daarom uitzoeken of verhoogde permeabiliteit door microbubble/ultrasound behandeling inderdaad kan leiden tot het versterken van het therapeutisch effect van bestraling in een klinisch relevant tumor model in proefdieren. De doelstellingen binnen deze aanvraag zijn:

1. Bewijs van toegenomen extravasatie en sonoporatie door ultrasound/microbubble behandeling door middel van histopathologische validatie in een vergelijking tussen onbehandeld en ultrasound/microbubble behandelde tumoren
2. Bewijs van een verhoogd therapeutisch effect van bestraling indien deze wordt gecombineerd met ultrasound/microbubble behandeling, door het effect van deze combinatie (bestraling voor en na ultrasound/microbubble behandeling) op de tumorgroei te vergelijken met de individuele behandelingen en geen behandeling.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is wetenschappelijk beoordeeld door het _____ onder leiding van _____ (hoofd laboratorium) en vervolgens goedgekeurd.

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

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor dit experiment willen we gebruik maken van NMRI nu/nu muizen. In de literatuur staat beschreven en uit vorige studies blijkt dat deze dieren uitermate geschikt zijn voor het bestuderen van tumor karakteristieken en tumor groei. 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

De sexe van de dieren is in dit experiment niet van belang.

7c. Aantallen

Experiment 1: immunohistochemie

Met een beoogd verschil van 35% en een variabiliteit van 16%, rekening houdend met een power van 80% ($F_{0,80} = 15.7$; uitleesparameter is het effect op **de hypoxische fractie en de microvezel densiteit**) en een uitvalspercentage van 10%, vragen we **4 proefdieren** aan ($N = 3.28$ zonder uitvalspercentage, $N = 3.65$ met uitvalspercentage = geen tumorgroei) per experimentele groep.

Met dit experiment willen we nagaan wat het effect is van ultrasound/microbubbles op de tumor micro-omgeving onmiddellijk na het uitvoeren van het experiment. Dit experiment omvat 2 experimentele groepen (geen behandeling en ultrasound/microbubbles) en daarom vragen we 8 proefdieren aan voor experiment 1.

Experiment 2: therapie studie

Met een beoogd verschil van 25% en een variabiliteit van 16%, rekening houdend met een power van 80% ($F_{0,80} = 15.7$; uitleesparameter is het effect op tumorgroei) en een uitvalspercentage van 10%, vragen we **8 proefdieren** aan ($N = 6.43$ zonder uitvalspercentage, $N = 7.14$ met uitvalspercentage = geen tumorgroei) per experimentele groep.

Group	Ultrasound/microbubbles	Bestraling
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4 A, B *	+	+

* deze behandelingsgroep omvat 2 onderdelen met telkens 8 proefdieren omdat we willen nagaan of er een verschil is tussen een ultrasound/microbubbles behandeling en dan bestraling, of eerst bestraling en dan ultrasound/microbubbles behandeling.

In totaal vragen we 5 (experimentele groepen) * 8 (proefdieren) = 40 proefdieren aan voor experiment 2.

Voor de totale studie vragen we 8 (exp 1) + 40 (exp 2) = **48** proefdieren aan.

5 Dierproef

8. Experiment

Algemeen

Alle experimenten beschreven in dit onderzoek gebeuren rekening houdende met de code of practice met betrekking tot dierproeven binnen kankeronderzoek (Code of Practice: dierproeven in het kankeronderzoek. Inspectie W&V). Eveneens werden de humane eindpunten op basis van dit document beargumenteerd.

In dit experiment worden muizen subcutaan geïnjecteerd in de flank met $1,5 \cdot 10^6$ HCT116 colorectale humane tumor cellen geresuspendeerd in 50 μ l matrigel, die zullen ontwikkelen tot een tumor. Het injecteren van de cellen vindt plaats onder fixatie. De cellen zijn getest op muismatchologische organismen en het resultaat hiervan wordt voorgelegd aan de art 14 functionaris. Tijdens het experiment worden de tumoren, wanneer voelbaar, 3x per week gemeten met behulp van een Vernier calliper. Dit gebeurt onder fixatie van het dier. De tumor wordt in 3 orthogonale tumor diameters A, B en C gemeten, waarbij elk wordt gecorrigeerd voor de huiddikte. De tumor groei wordt vervolgens berekend door de formule: $A \times B \times C \times \pi/6$, dit omdat de tumor elliptisch groeit.

Experiment 1:

In het eerste experiment willen we nagaan of ultrasound/microbubbles behandeling een effect heeft op de bloedvaten in de tumor met daaruit volgend meer zuurstof influx in de tumor. Hiervoor worden tumoren (na randomisatie) bij een gemiddeld volume van 150 mm³ blootgesteld aan ultrasound behandeling (2MPa, 3% duty cycle) terwijl microbubbles ($1 \cdot 10^8$) via een staartvene canule worden toegediend. Deze behandeling gebeurt onder isoflurane anesthesie (inductie 4%, onderhoud 1-2%) met oogzalf ter voorkoming van uitdroging van de ogen. Binnen een uur na deze behandeling worden de proefdieren opgeofferd en de tumor verwijderd voor verdere histopathologische studies. De totale duur van dit experiment wordt bepaald door de groeisnelheid van de tumoren en zal maximaal 1 maand zijn.

Experiment 2:

Bij een tumorvolume van gemiddeld 150 mm³, worden de dieren gerandomiseerd over de verschillende behandelingsgroepen en behandeld volgens onderstaand schema's.

1. Anesthesie → toediening saline i.v. → sham ultrasound → sham bestraling
2. Anesthesie → toediening microbubbles i.v. → ultrasound → sham bestraling
3. Anesthesie → toediening saline i.v. → sham ultrasound → bestraling
4. Anesthesie → toediening microbubbles i.v. → ultrasound → bestraling
5. Anesthesie → bestraling → toediening microbubbles i.v. → ultrasound

Dosis microbubbles: $1 \cdot 10^8$ /muis (gedurende de ultrasound behandeling, met een infuuspomp via een staartvenecanule). Ultrasound: 2MPa, 3% duty cycle (10 minuten). Bestraling 10Gy (30 minuten voor of na ultrasound/microbubbles). De ultrasound/microbubbles behandeling gebeurt onder isoflurane anesthesie (inductie 4%, onderhoud 1-2%). Bestraling onder injectie anesthesie (100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix i.p. = 1 injectie). Tijdens de behandelingen wordt oogzalf aangebracht ter voorkoming van uitdroging van de ogen.

Daarna wordt de tumorgroei gevolgd totdat minstens 4x het volume van bij de start van de behandeling wordt bereikt om zo specifieke groeivertraging te kunnen bepalen. Wanneer dit volume bereikt wordt, worden de proefdieren opgeofferd en de tumor verwijderd voor verdere histopathologische studies. De duur dat de dieren in experiment zijn wordt bepaald door de groeisnelheid van de tumoren na behandeling en zal maximaal 4 maanden duren.

Einde experiment (geldt voor experiment 1 en 2):

Bij het beëindigen van het experiment (exp 1: na behandeling; exp 2: 4x tumor volume vergeleken met start behandeling of wanneer de gezondheidstoestand van een dier verslechtert (zie humane eindpunten)), zal het dier worden geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. Een uur voor het euthanaseren van de dieren wordt door middel van een i.p. injectie pimonidazole (60 mg/kg, ter indicatie van hypoxische gebieden) en BrdU (30 mg/kg, ter indicatie van prolifererende cellen) toegediend. 1 minuut voor euthanaseren wordt door middel van een i.v. injectie ³³³⁴² (15 mg/kg, ter analyse van de 'microvessel density') toegediend. Na euthanasie zal de tumor worden verwijderd en worden gebruikt voor histologische analyse.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie gebeurt in overeenstemming met het standaard protocol van het CPV van de Universiteit van Maastricht. Anesthesie wordt uitgevoerd door middel van (1) isoflurane beademing (inductie 4%, onderhoud 1-2%) tijdens ultrasound/microbubbles behandeling en door middel van (2) een intraperitoneaal combinatie injectie 100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie) tijdens bestraling. Detomidine en dexmedetomidine kunnen als alternatief voor xylazine gebruikt worden, dit na overleg met de art. 14 functionaris. Het gebruik van atipamezole hierbij dient ook te worden overlegd met de art. 14 functionaris. Tijdens de duur van anesthesie wordt oogzalf aangebracht teneinde voorkoming van uitdroging van de ogen.

9b. Pijnbestrijding

Tijdens deze studie verwachten we dat de dieren geen significante pijn ondervinden. De subcutane injectie om de tumorcellen te injecteren en vervolgens de groei van de tumoren zal naar verwachting en ervaring geen pijn met zich mee brengen waardoor pijnmedicatie niet noodzakelijk is. Ultrasound en bestraling op zich veroorzaken geen significante pijn.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De dieren worden ge-euthanaseerd (onder isofluraan (inductie 4%, onderhoud 1-2%) sedatie) door cervicale dislocatie bij ziekte (uitdroging en vermagering (>20%/dag), open wonden bij necrose en wanneer de maximaal toegestane tumorlast (2 cm³) wordt bereikt.
- Humane eindpunten waarbij euthanasie gebeurd zijn ziekte (vast te stellen door onderzoeker, proefdierversorger) en wanneer de maximaal toegestane tumorlast (2 cm³) wordt bereikt. Na ultrageluid behandeling zal extra gelet worden op bloedinguitstortingen en oedeem op de behandelde plaats.
- Het proefdier wordt onmiddellijk ge-euthanaseerd wanneer er sprake is van een open wond bij sterk extern necrotiserende tumoren (komt vooral voor bij grotere tumoren) en wanneer er vocht lekt uit deze open wond.

10a. Ongerief

Tumorimplantatie (matig = 03): 1x voor exp 1 en 2.

Tumorcellen worden onder fixatie subcutaan geïnjecteerd.

Tumorgroei en tumor load (matig = 03): gedurende het hele experiment = max 1 maand voor exp 1 en max 4 maanden voor exp 2

Experimenten starten bij een volume van 150 mm³. De groei van tumoren veroorzaakt op zich weinig ongerief. We verhogen echter de ongerief score omdat het eindpunt van de studie de tijd is om 4x het start volume bij de start van de therapie te bereiken. Hierdoor werken we met relatief grote tumoren, wat het aangegeven ongerief voor deze tumor load verklaart.

Meten van tumorgrootte (matig = 03): 3x per week gedurende het hele experiment = max 1 maand voor exp 1 en 4 maanden voor exp 2.

Het meten van de tumor op zich zal zeer gering ongerief te weeg brengen, maar het herhaaldelijk fixeren zal zorgen voor matig ongerief.

Ultrasound (matig = 03): 1x voor exp 1 en 2.

Onder isoflurane anesthesie (inductie 4%, onderhoud 1-2%) wordt het dier onder het toestel gepositioneerd. De tumor zelf wordt volledig omgeven met een gel om de signaaltransductie optimaal te houden en de ultrasound probe wordt hierin boven de tumor gepositioneerd. De totale duur van ultrasound blootstelling (2MPa, 3% duty cycle) bedraagt 10 minuten. Indien er wat normaal weefsel wordt blootgesteld, kan er hematoom vorming optreden gedurende enkele dagen, maar zal naar verwachting beperkt blijven door nauwkeurige positionering.

Bestraling (matig/ernstig = 04): 1x voor exp 2.

Het is noodzakelijk om de dieren onder verdoving (injectie anesthesie 100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix) te brengen gedurende de bestraling. Gezien de exacte lokalisatie (thv de tumor) van het bestralingsveld en de dosis (10 Gy) zullen de dieren geen systemische hinder ondervinden van de bestraling. Een huidreactie ter hoogte van de tumor kan geïnduceerd worden, maar zal naar verwachting en ervaring beperkt blijven.

Toedienen microbubbles (matig = 03): 1x voor exp 1 en 2.

Een staartvene canule zal onder isoflurane anesthesie (inductie 4%, onderhoud 1-2%) aangebracht worden, eenmalig. Microbubbles ($1 \cdot 10^8$ /muis) zullen eenmalig via deze canule geïnjecteerd worden.

Injectie pimonidazole/BrdU (gering/matig = 02): 1x voor exp 1 en 2.

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 voor exp 1 en 2.

1 minuut voor euthanaseren, wordt bij fixatie (staart fixator) door middel van een i.v. injectie Hoechst 33342 (15 mg/kg) toegediend.

Doden van de muis en verwijderen van de tumor (gering = 01): 1x voor exp 1 en 2.

Op het einde van het experiment wordt het dier onder sedatie ge-euthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. Onmiddellijk hierna wordt de tumor verwijderd. Aangezien het verwijderen post mortem gebeurt is er geen sprake van ongerief.

taak	Exp. 1			Exp. 2		
	frequentie	duur	ongerief	frequentie	duur	ongerief
Tumor implantatie	1x	1 min	03	1x	1 min	03
Tumor groei en load	continu	1 maand	03	continu	1 maand	03
Meten tumor grootte	3x/week	1 maand	03	3x/week	1 maand	03
Ultrasound	1x	15 min	03	1x	15 min	03
Bestraling	1x	1 min	04	1x	10 min	04
Injectie microbubbles i.v.	1x	5 min	03	1x	5 min	03
Injectie 5-fluorouracil/BrdU	1x	1 min	02	1x	1 min	02
Injectie Hoechst i.v.	1x	1 min	03	1x	1 min	03
Opofferen dier	1x	1 min	01	1x	1 min	01
TOTAAL			03			04

10b. Welzijnsevaluatie

Een welzijnsevaluatie (ongerieflogboek) wordt bijgehouden en wordt in geval van de groei curve experimenten vergeleken met vorige resultaten.

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.

NMRI-nu nu/nu muizen worden gehuisvest in filtertop/IVC kooien op , in groepen van max 4 muizen. Water en voedsel worden verstrekt ad libitum. Kooien worden volgens de standaardregels onderhouden. Kooiverrijking dient voorzien te worden. In het geval van calamiteiten contact opnemen met VO of VVO.

12. Deskundigheid

De experimenten zullen worden uitgevoerd door een art. 9 en een art. 12 in het onderzoek beide met meer dan 5 jaar ervaring.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Implantatie van tumoren:

Voorafgaand aan de experimenten worden, nadat de dieren gedurende een week in afzondering op het CPV zijn geweest, de tumoren subcutaan geïmplanteerd. De cellijn zal ter beschikking gesteld worden aan de bevoegde instanties in verband met microbiologische screening. Hiertoe worden de dieren gefixeerd en vervolgens wordt 1.5×10^6 HCT116 cellen geresuspendeerd in 50 μ l matrigel ingespoten in de flank van de muis. De gemaakte incisie wordt na het voorzichtig terugtrekken van de naald gedurende een korte periode manueel dichtgehouden. Daarna kan de laesie op spontane wijze genezen. Wanneer de tumoren voelbaar aanwezig zijn, worden de tumoren opgemeten met een Vernier calliper.

Ultrasound/microbubbles:

Muizen worden onder verdoving gebracht met isoflurane anesthesie (inductie 4%, onderhoud 1-2%) 5 minuten voor behandeling. Een intraveneuze staartvene canule wordt aangebracht waardoor microbubbles (1×10^8 /muis) met een constante flow zullen worden geïnjecteerd. Vooraleer microbubbles worden geïnjecteerd wordt het proefdier gepositioneerd onder het ultrasound toestel. De transducer wordt gekoppeld aan de TIPS therapie probe houder met een beeldvormingsveld loodrecht op de richting van de ultrasound therapie. De tumor wordt volledig omgeven door ultrasound gel voor goede geleiding van het signaal. Na injectie van de microbubbles, wordt ultrasound (2MPa, 3% duty cycle) gestart binnen 30s gedurende 10 minuten. Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat. Tijdens de narcose wordt er oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te vermijden.

Bestraling:

De proefdieren worden in een afgesloten kooi vervoerd naar MaastrichtClinic. Daar worden ze onder algehele verdoving gebracht met een intraperitoneale combinatie injectie van 100 mg/kg + 10 mg/kg ketamine/xylazine mix (= 1 injectie) 10 minuten voor behandeling. Tijdens de narcose wordt er oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te vermijden. Bestraling gebeurt in een voor muizen aangepaste module waarbij enkel de tumor in het stralingsveld ligt (de rest van de muis wordt afgedekt met een loodafscherming van 2 cm dikte). Vervolgens zal de tumor met een gamma straling, met een tevoren bepaalde dosis (10 Gy) op een tevoren berekend plan bestraald worden. De gehele procedure zal ongeveer 10 minuten in beslag nemen. Wanneer bestraling gebeurt na ultrasound/microbubbles, wordt dit gedaan 30 minuten na deze behandeling.

injecties:

Muizen worden eenmalig intraveneus via de staartvene (na fixatie in een staartfixator) geïnjecteerd met 15 mg/kg Hoechst 1 minuut voor het opofferen van het proefdier.

Pimonidazole/BrdU injecties:

Muizen worden I.P. geïnjecteerd met 60 mg/kg pimonidazole en 30 mg/kg BrdU 1 uur voor opofferen van de proefdieren.

Relevante literatuur

Böhmer MR et al, Ultrasound triggered image-guided drug delivery, EJR 2009

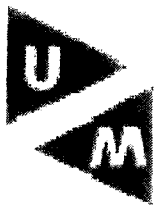
Böhmer et al, Focused ultrasound and microbubbles for enhanced extravasation. J Contr Release 2010

Hernot en Klibanov, Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev 2008

Karshafian R et al, Ultrasound-activated microbubbles as novel enhancers of radiotherapy in leukemia cells in vitro, 2009 IEEE Int Ultrasonics Symp Proc 1792-1794

Karshafian R et al, Enhancement of radiation therapy by ultrasonically-stimulated microbubbles in vitro: effects of treatment scheduling on cell viability and production of ceramide, 2010 IEEE Int Ultrasonics Symp Proc, 2115-2118

Lentacker et al, Microbubbles which bind and protect DNA against nucleases. J Contr Release 2006



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Microbubbles en Ultrasound om het effect van bestraling te verhogen*", is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 7c de uitleesparameter van experiment 1, eenduidig te benoemen (d.w.z. vervang 'de micro-omgeving van de tumor' met concrete uitleesparameter van het experiment).
- 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 of 05 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 2011-112, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan
Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 5 September 2011

Betreft: project 2011-042 opmerkingen

Geachte voorzitter DEC,

Naar aanleiding van uw opmerkingen op de projectaanvraag 2011-112 "*Microbubbles en Ultrasound om het effect van bestraling te verhogen*", wil ik volgende antwoorden formuleren.

- De DEC verzoekt bij punt 7c de uitleesparameter van experiment 1, eenduidig te benoemen (d.w.z. vervang 'de micro-omgeving van de tumor' met concrete uitleesparameter van het experiment).

De uitleesparameter werd eenduidig benoemd: de micro-omgeving van de tumor werd vervangen door specifiek de hypoxische fractie en de micro-vezel densiteit.

- 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 of 05 is (eventueel ook op het voorblad aanpassen).

De tekst is bij 10a omgezet in tabelvorm per experiment groep. Ik ben ermee akkoord dat het totale ongerief score 04 wordt voor exp 2, terwijl dit 03 blijft voor exp 1. Dit is zoals voorheen reeds aangegeven op het voorblad.

aard	Exp 1			Exp 2		
	frequentie	duur	ongerief	frequentie	duur	ongerief
Tumor implantatie	1x	1 min	03	1x	1 min	03
Tumor groei en load	continu	1 maand	03	continu	4 maand	03
Metten tumorgrootte	3x/week	1 maand	03	3x/week	4 maand	03
Ultrasound	1x	15 min	03	1x	15 min	03
Bestraling	-	-	-	1x	10 min	04
Injectie microbubbles i.v.	1x	5 min	03	1x	5 min	03
Injectie pimonidazole/BrdU i.p.	1x	1 min	02	1x	1 min	02
Injectie Hoechst i.v.	1x	1 min	03	1x	1 min	03
Opofferen dier	1x	1 min	01	1x	1 min	01
TOTAAL			03			04

Met vriendelijke groeten,

Aan: |

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043

Maastricht
08-09-2011

Project: *Microbubbles en Ultrasound om het effect van bestraling te verhogen.*

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: 2011-112

Diersoort: muis

Aantal dieren: 48

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