



# Retro-orbitale injectie van radioactieve stoffen bij gebruik in een PET scanner

Inge de Greeuw en Rianne Bergstra

*Afdeling Radiologie en Nucleaire Geneeskunde, VU medisch centrum Amsterdam.  
i.degreeuw@vumc.nl.*

## Prijs Alternatieven voor Dierproeven

Zoals elk jaar werd ook in 2012 tijdens de Biotechnische Dagen de Prijs Alternatieven voor Dierproeven uitgereikt. Deze prijs werd ingesteld door de minister van VWS en wordt jaarlijks uitgereikt aan een biotechnicus, analist of proefdiervoorzorgster die zich heeft ingezet voor de 3V's. Wij hebben een voorstel ingediend voor een verfijning van een bestaande techniek die zorgt voor een hoger slagingspercentage van tracerinjecties bij de muis en daardoor voor een vermindering van het aantal proefdieren. De commissie vond de techniek veelbelovend waardoor wij de prijs in ontvangst mochten nemen.

## Samenvatting

Bij gebruik van imaging m.b.v. Positron Emissie Tomografie (PET) is het noodzakelijk een lage dosis van een licht radioactieve stof toe te dienen, de PET tracer. De injectie van de tracer gebeurt via een vene.

PET scanning is zeer gevoelig voor beweging en daarom moet beweging in het gebied waar het dier ligt, het Field of View (FOV), voorkomen worden. Er zal dus altijd 'op afstand' geïnjecteerd moeten worden d.m.v. een extra lange toedieningscanule.

Er zijn verschillende methoden om in een vene te injecteren. De verschillende methoden hebben allemaal hun voor- en nadelen. De retro-orbitale injectie met een verlengcanule is nog geen bekende methode. Deze methode is betrouwbaar en gemakkelijk en daarom een uitstekend alternatief voor de huidige injectietechnieken.

## Inleiding

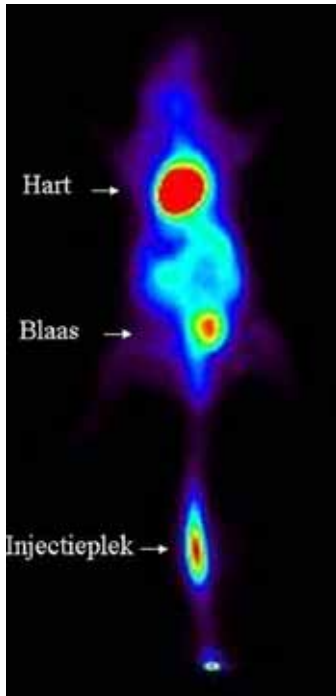
Binnen de afdeling Radiologie en Nucleaire Geneeskunde van het VUmc wordt veel onderzoek gedaan op het gebied van kanker en het monitoren van de respons op (nieuwe) geneesmiddelen. Met de gebruikelijke imagingtechnieken zoals echografie, CT en MRI kunnen volumeveranderingen van de tumor(en) na behandelingen met medicijnen anatomisch goed worden vastgesteld. Het nadeel van de conventionele technieken is dat deze volumeveranderingen pas na geruime tijd zichtbaar worden en daarnaast weerspiegelt een volumeverandering niet automatisch een goede respons. Voor dit doel is PET een veel betere imagingmethode omdat »

het een functionele imaging techniek is die metabole processen van de tumorcellen in beeld kan brengen. Omdat metabole veranderingen eerder plaatsvinden dan volumeveranderingen kan al eerder de werkzaamheid van een geneesmiddel worden bepaald.

Voor het onderzoek naar de waarde van PET bij response monitoring is preklinisch onderzoek met proefdieren noodzakelijk. Dit gebeurt op onze afdeling vooral met muizen en ratten en een preklinische PET scanner genaamd de 'High Resolution Research Tomograph' (HRRT), waarin maximaal 6 muizen of 2 ratten tegelijk kunnen worden gescand.



Afbeelding 1. HRRT op de linker afbeelding en de rechter afbeelding laat het 'muizenhotel' zien met de 2 perspex platen waarop de muizen liggen (maximaal 6 muizen tegelijk).



Voor het toedienen van de PET tracer is een injectie via een vene nodig. Om de beeldkwaliteit te waarborgen moet beweging in het FOV tot een minimum beperkt worden. Daarom zul je van buiten het FOV moeten injecteren. Injectie kan plaatsvinden via de staartvene of *vena jugularis* door middel van een verlengcanule.

Door uitwisseling van ervaringen met andere biotechnici uit meerdere instituten in binnen- en buitenland en met name degenen die PET studies doen, is gebleken dat staartvene-injecties in 15 -25 % tot een foutieve injectie leidt (zie afb. 2). Vaak wordt dit niet vermeld omdat juist bij microPET scanners de staart buiten het FOV valt en dus niet op het uiteindelijke plaatje te zien zal zijn. Juiste of foutieve injecties worden dan niet opgemerkt.

Omdat het canuleren van de *vena jugularis* meer tijd kost en microchirurgische ervaring vereist, zijn we op zoek gegaan naar een alternatief. Belangrijk hierbij is dat de verdeling van de radioactieve PET tracer in het dier overeenkomt met een correcte injectie. De retro-orbitale (R.O.) injectie zou hier een goed alternatief voor kunnen zijn. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de directe R.O. injectie betrouwbaar, snel en zeer geschikt is voor survival studies (1). Omdat directe R.O. injectie niet mogelijk is in de scanner (want de muis ligt in het FOV en de scanopname start vlak vóór injectie van de PET tracer) hebben wij hiervoor een oplossing ontwikkeld.

Afbeelding 2. Coronale doorsnede van een muis waarbij de tracer geïnjecteerd is via de staartvene. Dit is een voorbeeld van een injectie waarbij de tracer gedeeltelijk subcutaan bleek te zijn geïnjecteerd en dit werd niet gevoeld tijdens de injectie.

## Materiaal en methoden

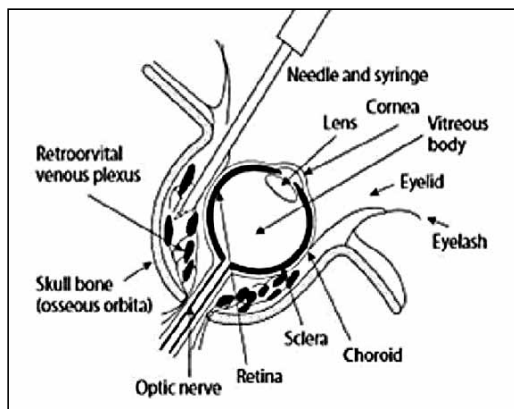
Er zijn surplus muizen gebruikt van Harlan (gewicht:  $25 \pm 5$  g). Na een week acclimatisatie werden de dieren over drie groepen verdeeld, te weten: staartvene-, *vena jugularis*- en R.O. canule- groep.

Bij alle muizen werd inhalatie-anesthesie gebruikt (inductie: 4 % isofluraan en 0.3 L O<sub>2</sub> / muis; onderhoudsanesthesie, 1.8-2.5 % isofluraan en 0.3 L O<sub>2</sub> /muis).

**Staartvene groep.** De dieren werden, na inductie-anesthesie, naar de tafel voor de HRRT gebracht en d.m.v. een warmtelamp verwarmd om het vaatbed extra te verwijden. Injectie van de staartvene vond plaats m.b.v. een 26 G i.v. catheter (Neoflon, perifeer, Terumo, Europe) gevuld met fysiologisch zout met 25 IE heparine/ml (FZH). Na juiste plaatsing van de catheter in de staartvene werd de catheter gefixeerd met tape en de muis op de perspex plaat die later het muizenhotel werd ingeschoven (afb. 1, rechts). In deze plaat zit een geïntegreerde warmteplaat die ingesteld staat op 37 °C. De dieren werden de gehele periode onder inhalatie-anesthesie gehouden. De totale duur van deze procedure bedraagt 10 min  $\pm$  5 min/muis.

**Vena jugularis groep.** De dieren werden geschoren in de halsstreek en gedisinfecteerd met 70 % ethanol. De temperatuur tijdens de operatie werd gereguleerd m.b.v. een warmtematje en gecontroleerd met een elektronische temperatuur probe (Fa. Vos, Amsterdam). In de halsstreek werd een incisie gemaakt, de *vena jugularis* vrij geprepareerd en gecanuleerd met een 2 French silicone canule (Dispo Medical, Hattem) met een lengte van 23 cm gevuld met FZH. Na canulatie werd de huid gesloten en werden de dieren op de HRRT plaat gefixeerd met tape. De totale duur van deze procedure bedraagt 30 min  $\pm$  5 min/muis.

**R.O. groep.** Ook deze dieren werden, na inductie-anesthesie, op de HRRT plaat gebracht en gecanuleerd met silicone canule (materiaal identiek aan die van de *vena jugularis* groep). Het inbrengen van het naaldje (27 G; verkort tot een lengte van ca. 1 cm en voor enkele mm in de canule geschoven [Terumo Europe]) vond plaats m.b.v. een anatomisch pincet. Tijdens fixatie van de schedel werd de naald geïntroduceerd, onder een 45° hoek met de opening van de naald naar het oog gericht aan de laterale zijde van het oog (insertie ca. 2 - 3 mm; afb. 3). De oogjes werden beschermd tegen uitdroging met oogzalf waarna de plaat in het HRRT hotel werd geschoven (muis en canule werden gefixeerd met tape). De totale duur van deze procedure bedraagt 5 min  $\pm$  2 min/muis.



Afbeelding 3. Schematisch overzicht van de retro-orbitale injectie in de muis met verlengcanule.

Voor het scanexperiment werd de PET tracer fluorine-18-fluorodeoxyglucose (FDG) gebruikt (halfwaardetijd ~ 110 minuten). De totale scanduur bedroeg 60 minuten. Per dier werd  $8 \pm 2$  MBq geïnjecteerd. Na een uur werden de dieren geofferd d.m.v. cervicale dislocatie en werden vele organen uitgenomen en gewogen. Daarna werd de radioactiviteit in de uitgenomen weefsels geteld in een gammacounter.

De PET scans werden geanalyseerd met het image-analyseprogramma AMIDE (versie 0.9.2). 3D regio's van interesse (ROI's) werden getekend waarna zogenaamde tijds-activiteits-curves kunnen worden verkregen, waarbij de hoeveelheid opgenomen radioactiviteit in de ROI (Bq/cc) werd gecorrigeerd voor het lichaamsgewicht van de muis en de hoeveelheid geïnjecteerde dosis van de tracer. Dit is dan de zogenaamde 'standardized uptake value' (SUV). »

## Resultaten

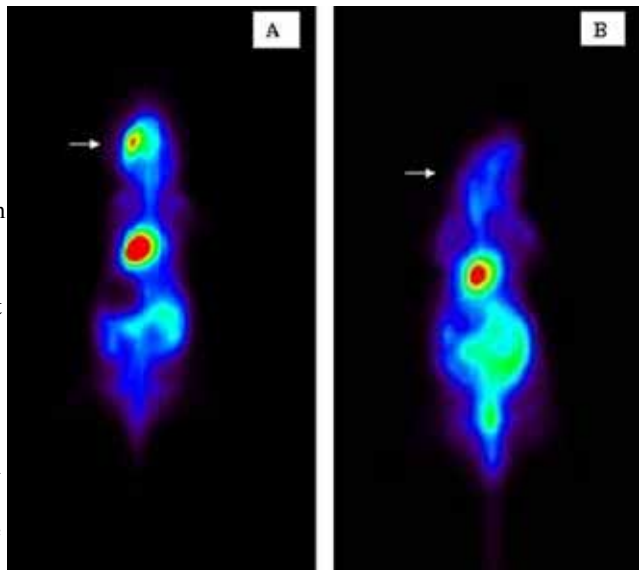
### Injecties

**Staartvene groep.** Bij 1 van de 6 muizen mislukte het plaatsen van de staartvene catheter (na meerdere pogingen). Bij het flushen van de catheter werd weerstand gevoeld, dat duidt op een onjuiste i.v. catheterisatie. Dit dier werd vervangen en alle catheterisaties werden goed bevonden. Uit de resultaten van de scan-analyse en de *ex vivo* biodistributiestudie werd toch bij 2 van de 6 muizen een subcutane ophoping in de staart gevonden, als gevolg van een niet geheel juiste injectie. Ook voor een ervaren biotechnicus is dit niet altijd op te merken. Dat is ook de reden dat het slagingsper-

centage van de staartvene catheterisatie vaak te hoog wordt ingeschat, omdat men denkt dat de canule goed zit en er geen weerstand wordt gevoeld bij de injectie van de vloeistof. Een PET scan uitvoeren met de staart van het dier **binnen** het FOV is een mooie controle of dit echt wel zo is.

**Vena jugularis groep.** De jugularis canulaties zijn bij alle muizen zonder complicaties geplaatst. Ook de tracer injecties verliepen goed. Dit bleek ook na scan-analyse en uit de resultaten van de *ex vivo* biodistributie.

**R.O. groep.** Het plaatsen van de R.O. canules verliep probleemloos. Analyse van de PET scan liet bij 2 van de 7 muizen een lichte ophoping zien bij de plaats van injectie (afb. 4), maar dit was zeer weinig en in tegenstelling tot de staartvene injectie niet aan te tonen via *ex vivo* biodistributie (zie latere paragraaf).

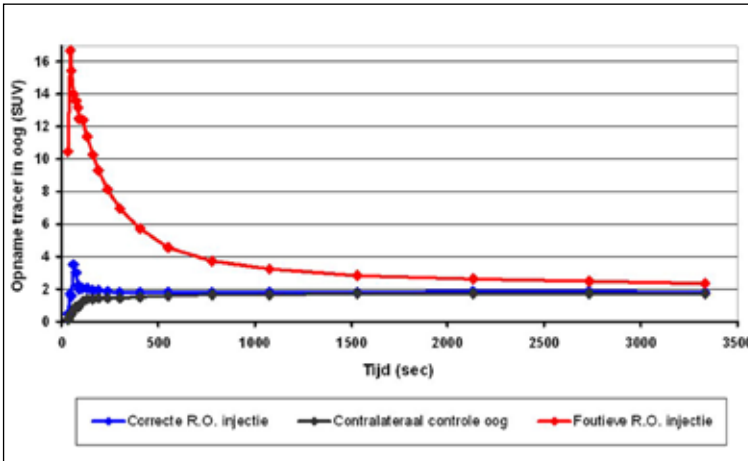


Afbeelding 4. Coronale doorsnede van een muis waarbij de tracer fluorine-18-fluorodeoxyglucose (FDG) geïnjecteerd is via R.O. injectie. A, in het linker oog is bij de injectieplaats verhoogde opname van de tracer te zien (zie pijltje). B, ooginjectie zonder verhoogde opname.

## PET scans

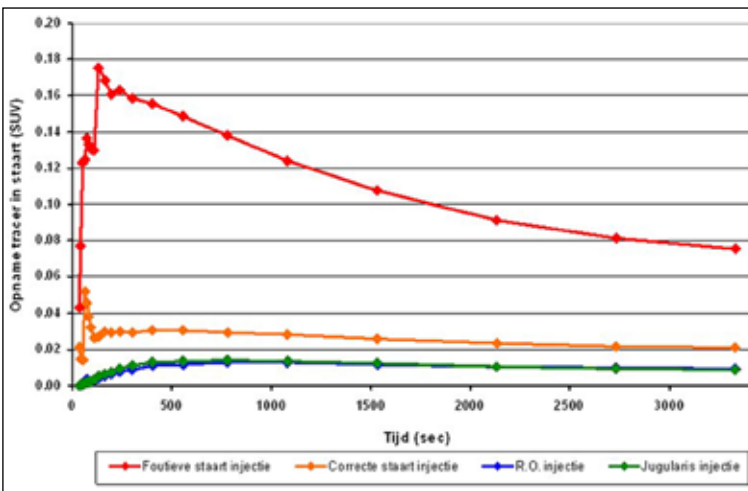
Na injectie van de tracer werd er 60 minuten dynamisch gescand. Nadat alle ruwe data omgezet waren zodat een PET image werd verkregen, kon op verschillende tijdstippen van de 60 minuten durende scan de hoeveelheid opgenomen radioactiviteit zichtbaar gemaakt worden in de weefsels. Er zijn verschillende ROI's getekend waarin de hoeveelheid radioactiviteit bepaald is en vervolgens werd omgerekend naar SUV.

Bij de correcte R.O. injectie (afb. 5, blauwe curve) is een kleine piek te zien tijdens het eerste tijdstip. De curve laat zien hoe lang het duurt voordat de tracer achter het oog (de injectieplek) verdwijnt en in de circulatie terecht komt. Uit de R.O. curve is te zien dat de tracer na ongeveer 95 seconden weg is waarna er geen verschil meer is te zien met de opname in de oog-ROI's van de staartvene groep en vena jugularis groep (contralaterale oog, grijze lijn). De rode lijn geeft de injectie weer van een 'foutieve' R.O. injectie. De consequentie hiervan is dat de verdeling van de tracer t.o.v. een correcte injectie vertraagd is. Na 60 minuten scan is de activiteit in de ROI 1.5 keer hoger dan bij een correcte injectie.



Afbeelding 5. Tijd-activiteitscurven van de tracer fluorine-18-fluorodeoxyglucose (FDG) in ROI's getrokken over het oog in de verschillende groepen. De correcte R.O. groep curve laat een kleine radioactiviteitspiek zien vlak na injectie in het oog die snel verdwijnt (blauwe curve) waarna de curve gelijk loopt met die van het controle oog (donkergrijze curve). Ter vergelijking zijn de resultaten van een foutieve R.O. injectie weergegeven (rode curve); de radioactiviteitspiek in de ROI van dat oog is hoog en blijft langer op de injectie plek aanwezig.

Bij een correcte staartvene injectie (afb. 6) is een kleine piek te zien tijdens het eerste tijdsmoment (oranje lijn). De tracer verdwijnt snel en komt in de circulatie terecht. De rode lijn geeft een foutieve staartvene injectie weer. Deze is na 60 minuten scan nog bijna 9 keer zo hoog als een correcte injectie in de staartvene. Echter blijft de opname in de staart na een correcte injectie nog 2,6 keer zo hoog als de opname via R.O. en jugularis injectie.



Afbeelding 6. Tijd-activiteitscurven van de tracer fluorine-18-fluorodeoxyglucose (FDG) in ROI's getrokken over de staart in de verschillende groepen. De correcte staartvene injectie (oranje curve) laat een piek zien tijdens de eerste paar seconden na injectie in de staart ten opzichte van R.O. en vena jugularis injectie. Ter vergelijking zijn de resultaten van een foutieve staartvene-injectie weergegeven (rode curve); de radioactiviteitspiek in de ROI van de staart is hoog en blijft langer ter plekke.

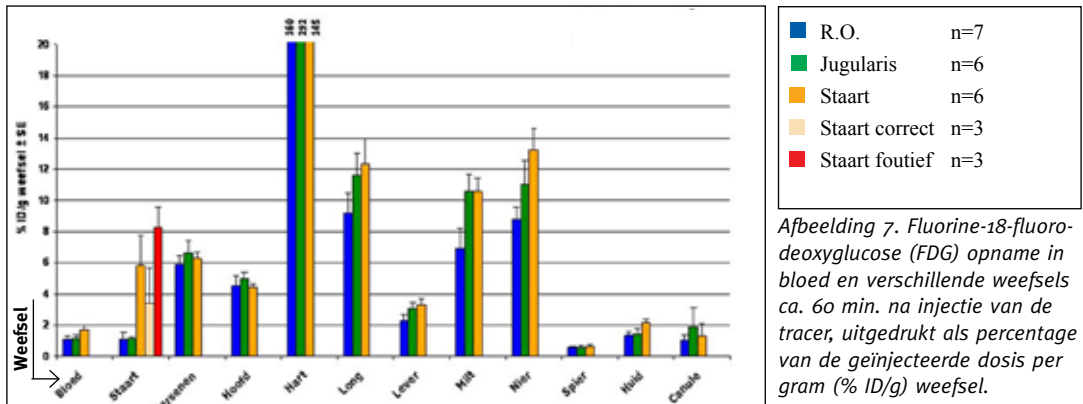
## Ex vivo biodistributie

Direct aansluitend aan de PET scan werden de dieren onder anesthesie geofferd d.m.v. cervicale dislocatie en vond een *ex vivo* biodistributie plaats (afb. 7). Na telling van de radioactiviteit in het bloed en verschillende weefsels, zien we in het bloed en de meeste weefsels weinig verschillen voor de drie groepen. Zelfs voor de opname in de hersenen en de kop zien we geen verhoogde opname als gevolg van de R.O. injectie. Alleen voor de opname in de staart zien we bij een foutieve injectie, in tegenstelling tot de R.O. en jugularis injectiegroep, een 7 % hogere opname.

## PET MR; verfijning

Naast onze huidige PET scanner zal binnenkort een micro-PET-MR voor diergebruik worden





Afbeelding 7. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose (FDG) opname in bloed en verschillende weefsels ca. 60 min. na injectie van de tracer, uitgedrukt als percentage van de geïnjecteerde dosis per gram (% ID/g) weefsel.

aangeschaft. De metalen naaldjes die bij dit experiment gebruikt zijn voor R.O. injectie kunnen dan niet gebruikt worden. Wij hebben gezocht naar een oplossing en de plastic hulsjes van een 26 G i.v. catheter (Neoflon, perifeer, Terumo, Europe) uitgetest. De smalle onderkant kan in de 2 French canule geschoven worden en de andere kant hebben we in een 45° hoek afgesneden voor de injectie in het oog. Dit werkt vergelijkbaar en het geheel blijft goed op zijn plaats zitten.

## Discussie en conclusie

Deze studie heeft aangetoond dat het injecteren van een vloeistof via R.O. injectie m.b.v. een naaldje met een verlengcanule een goed alternatief is voor injecties via de staartvene of via de *vena jugularis* in een PET scanner.

Het hoge slagingspercentage van de R.O. injectie ( $\geq 95\%$ ) vermindert het aantal benodigde proefdieren ten opzichte van staartvene injecties (slagingspercentage 75-85%). Vergeleken met de operatie die nodig is voor injecties via de *vena jugularis* wordt een grote tijds winst gehaald: ca. 25 minuten per dier (verfijning).

De analyse van de PET scans laat zien dat de opname en verdeling van de geïnjecteerde tracer via de R.O. route uitstekend is en vergelijkbaar met een correcte injectie via de staartvene en *vena jugularis*. Zelfs een minder goede R.O. injectie geeft nog uitstekende resultaten.

Indien bij injecties via de staartvene de tracer soms gedeeltelijk subcutaan terecht komt (vaak zonder dat dit gemerkt wordt) is de opname en verdeling van de tracer over de tijd niet correct. Na analyse blijkt dat er ca. 7 keer zoveel opname was in de staart, dan wanneer de injectie via R.O. of *vena jugularis* is gegaan.

Door deze resultaten kunnen wij injectie van een tracer via R.O. injectie met de door ons ontwikkelde verlengcanule aanraden voor PET studies. De dieren vertoonden geen problemen aan het oog, terwijl bij de injectie in de staart vaak wel beschadigingen zichtbaar zijn. Ook canulatie van de *vena jugularis* zorgt bij survivaldieren voor ongerief.

Door de verfijning van de i.v. injectietechniek wordt het aantal benodigde dieren vermindert; er is minder uitval door foutieve injecties, dieren kunnen gemakkelijker meerdere malen worden gebruikt en de techniek is eenvoudig aan te leren en snel uit te voeren.

Deze techniek kan worden toegepast bij alle studies waarbij (herhaalde) i.v. injecties gewenst zijn. Wel raden wij af om deze R.O. injectietechniek bij hersenstudies te gebruiken omdat er mogelijk direct na de injectie een lichte ophoping in het injectiegebied (niet in de hersenen) uit de resultaten naar voren kwam en dit mogelijk analyses in de hersenen lastiger maakt.

## Literatuur

1. Nanni C, Pettinato C, Ambrosini V, et al. (2007). *Retro-orbital injection is an effective route for radiopharmaceutical administration in mice during small-animal PET studies*. Nuclear Medicine Communications 28: 547-553.

«