

EXPERIMENTEEL DIERENLEED

Ioniserende straling beïnvloedt het leven op aarde. Hoe valt dat systematisch te onderzoeken? Wat zijn grenswaarden, veilige marges en welke dosis zorgt voor welk effect? Daar zijn experimenten voor nodig, maar waar zijn de vrijwilligers? Bij gebrek daaraan worden dieren gebruikt, heel veel dieren.

Na de Tweede Wereldoorlog hebben de Amerikanen diverse kernproeven uitgevoerd nabij het Bikini-atol (Operation Crossroads). Grote oorlogsschepen werden strategisch gepositioneerd om na te gaan of deze bestand waren tegen een nucleaire explosie. De aandacht was niet alleen gericht op materiële schade, ook was er belangstelling voor de effecten op proefdieren die aan boord waren achtergelaten. Twee atoombommen werden in juli 1946 tot detonatie gebracht. Enkele schepen zonken vrijwel direct, andere waren beschadigd en zonken pas later. Vrijwel geen van de muizen, ratten, geiten en varkens die aan boord waren, heeft de hitte, schokgolf en stralingsdosis overleefd. Nadien moesten de observatieboten worden schoongemaakt, maar de radioactieve vervuiling bleek zo aanzienlijk dat het vegen, boenen en spoelen gevaar opleverde voor de bemanning. Een veiligheidsdeskundige kon de marinecommandant over-

tuigen om af te zien van een derde test met een plaatje van een vis uit de lagune. De vis was dermate radioactief dat deze, zonder belichting, een eigen afdruk had achtergelaten op de fotografische plaat [1].

Fruitvliegen

Vanaf het begin van de twintigste eeuw bleek de energie van röntgentoestellen en radioisotopen geschikt te zijn voor medisch en fysisch gebruik. Daarna bleken toestellen en isotopen ook te kunnen worden toegepast voor biologisch onderzoek. Door het bestralen van fruitvliegjes (*Drosophila melanogaster*) was het mogelijk eigenschappen in de erfelijkheidsstructuur te beïnvloeden. Normaal is een grote populatie nodig om een spontane mutatie te vinden, bijvoorbeeld een mannetje met witte ogen, maar het toeval op een dergelijke mutant valt te sturen. In 1927 liet de Amerikaanse geneticus Hermann Muller zien dat met ioniserende straling veel sneller mutaties te creëren waren.

Het bestralen van de vliegjes veroorzaakte aanvankelijk onvruchtbaarheid bij de meeste gemuteerde exemplaren. Na veelvuldig proberen vond Muller de instelling voor de juiste stralingsdosis en kon hij wel vruchtbare mutanten verkrijgen. Fruitvliegjes leggen honderden eitjes per dag en een volgende generatie dient zich al na twee weken aan. Zo ontstonden vliegjes die zich in de natuur niet zouden voordoen. Hij vond vliegjes met rudimentaire vleugels, er traden zwarte mutanten op en varianten die niet levensvatbaar bleken [2]. Voor de experimenten van Muller en zijn tijdgenoten zijn bijzonder veel vliegjes gebruikt, vele miljarden zijn bestraald, ontleed en onderzocht. Fruitvliegjes zijn daarmee fraai onderzoeksmateriaal voor evolutie-experimenten, waarvan tegenwoordig nog met genoegen gebruik wordt gemaakt [3].

Muizen

Als mutaties zijn te versnellen bij



Vis die radioactief was geworden na de nucleaire test van Operation Crossroads.



Onderzoek aan muizen in het Oak Ridge National Laboratory in de jaren vijftig van de vorige eeuw. Foto: Oak Ridge National Laboratory.

insecten, manifesteert zich dat effect dan ook bij zoogdieren? Ongetwijfeld, zo was het vermoeden en daar is grootschalig onderzoek naar gedaan. In het Oak Ridge National Laboratory zijn muizen gebruikt die spontane mutaties kenden, zoals vachtkleur (gevekt, lichtbruin of zwart) en een onvolgroeid oor. Met behulp van straling viel het optreden van deze mutaties te verhogen. De belangrijkste bevindingen volgen hier [4]:

- Vacht- en oormutaties bleken verschillend gevoelig te zijn voor straling. De reden daarvoor was in de jaren zestig nog onbekend, maar heeft te maken met de lengte van de genen die verantwoordelijk zijn voor de mutatie.
- Vrijwel alle onderzoeksresultaten zijn gebaseerd op de mannelijke muizen. Het bleek dat bij de muis de oöcyten buitengewoon stralingsgevoelig zijn, zelfs al bij een lage dosis. Dat impliceert dat stralingsschade geslachtsspecifiek is.
- Het geleidelijk dan wel langdurig toedienen van dezelfde dosis bleek verschillende effecten te hebben. Wanneer dezelfde hoeveelheid straling over een langere periode in een lagere intensiteit wordt

toegediend, ontstaan minder mutaties. Oftewel, bij gefractioneerd toedienen is in de tussenliggende tijd een herstelproces in werking waardoor het lichaam in staat is de aangerichte schade te herstellen.

Dit laatste resultaat was onverwacht. Op basis van de mutaties van de fruitvliegjes was de opvatting ontstaan dat de stralingsschade een cumulatief karakter had. Dat betekent dat de stralingsenergie die vandaag, morgen en volgende week wordt opgelopen, additief is en zorgt voor toenemende lichamelijke schade. Dat bleek dus onjuist.

Deze vondst heeft een belangrijke bijdrage geleverd aan de behandeling van tumoren. Bij een eenmalige bestraling worden de tumorcellen gedood, maar ook het omringende weefsel. Door gefractioneerd te bestralen gaan op de lange termijn effectief meer tumorcellen kapot dan gezonde cellen. De reden daarvoor is dat de tumorcellen gevoeliger zijn voor de toegediende dosis, aangezien het tempo van hun celdeling hoger is. Ze bevinden zich vaker dan gewone cellen in de fase van celdeling. Jarenlang is er gewerkt met muizen. Het echtpaar Lee en Bill Russell heeft meer dan zeven miljoen muizen ge-

bruikt voor hun onderzoek, dat – niet voor niets – bekend is geworden onder de naam Mega Mouse Project (1947-2009). Tegenwoordig zijn muizen nog steeds populair en krijgen ze straling toegediend voor diverse gevoeligheidstesten, voor de impact op longen, dunne darm en ooglenzen (om de mate van staar te bepalen). Hoewel ook andere knaagdieren zoals ratten en hamsters en haasachtigen zoals konijnen worden gebruikt, worden muizen alom geprefereerd. Ze zijn klein, niet veeleisend, gewillig en makkelijk hanteerbaar.

Honden

Het extrapoleren van de stralingsschade bij insecten en knaagdieren naar de mens is lastig en statistisch onbetrouwbaar. De basisprincipes mogen bekend zijn, maar wat is de impact op grotere dieren? Hoeveel ioniserende straling is fataal? Daarvoor is een concept geïntroduceerd, de LD_{50} , de lethale dosis voor 50% van de populatie. Oftewel de dosis (in Gy, Gray = J/kg ioniserende straling) die een individu ontvangt en zorgt voor een fiftyfifty-kans om deze stralingsschade te overleven. De aandacht richt zich met name op de meest stralingssensitieve delen, het beenmerg (BM) waar stamcellen wor-

Score	Huidrespons
0	Geen zichtbare reactie
1	Zwak erytheem
2	Erytheem (roodheid van de huid)
3	Duidelijk erytheem
4	Natte desquamatie van minder dan de helft van het bestraalde gebied
5	Natte desquamatie van meer dan de helft van het bestraalde gebied

Beoordeling response van varkenshuid na bestraling met röntgentoestel.

den gevormd, het maag-darmstelsel (GI, gastro-intestinaal) waar de opname van voedingsstoffen plaatsvindt en de longen (longblaasjes).

De mate waarin mensen gevoelig zijn voor een totale lichaamsbestraling kan worden geschat op basis van resultaten bij andere zoogdieren. Favoriet voor dergelijke experimenten is de trouwe, rustige en aanhankelijke beagle. In een onderzoek [5] worden de dieren (12 kilo) over het hele lijf bestraald, waarna hun ziektebeeld wordt gevolgd. Er worden diverse samples genomen (en in geval van overlijden volgt autopsie). Als resultaat wordt gevonden voor het GI-syndroom een $LD_{50} = 8,5$ Gy en voor het BM-syndroom $LD_{50} = 3,7$ Gy. Deze resultaten zijn omgerekend naar de mens. Afhankelijk van de fysieke toestand en de medische zorg die kan worden geboden, geldt een LD_{50} -range van 3 tot 10 Gy.

Een ander voorbeeld van onderzoek met beagles betreft het beoordelen van specifieke radiotoxiciteit, zoals van isotopen als $^{137}\text{CsCl}$, $^{90}\text{SrCl}_2$, ^{239}Pu -citraat en $^{241}\text{AmO}_2$. Daarbij is vooral gelet op schade aan geslachtsdelen, lever, lymfeklieren, milt en nieren [6].

Varkens

Ook varkens (*Sus domesticus*) zijn geschikt om stralingseffecten op de mens te onderzoeken. Het betreft dan speciaal de huid, die net als de menselijke huid weinig behaard is, gevoelig is voor zonlicht en voorzien is van haarzakjes, zweetklieren en een

onderhuidse vetlaag.

Bij de behandeling wordt een gemarkeerde plek op de zijkant van het varken bestraald met een röntgentoestel gedurende vijftien minuten. Daarna wordt een andere plek bestraald, een langere tijd met een andere dosis. Op die manier ontstaat een patroon aan bestraalde huidoppervlakken. Vervolgens wordt gekeken naar de huidrespons. Daar is een kwalitatieve indeling voor gemaakt, zie de tabel [7].

De dieren die een eenmalige dosis kregen (gemiddeld 20 Gy) vertoonden een score van 1 tot 3. In een enkel geval manifesteerde zich een natte desquamatie (verveling van de bovenste huidlaag), maar na een week was dit hersteld. Gedurende drie maanden werden de varkens geobserveerd en in al die tijd verminderde de huidrespons niet, de huid herstelde zich niet van de subcutane schade.

Andere dieren kregen hun dosis gefractioneerd toegediend, 21 keer in 28 dagen, waarbij een totale dosis werd gegeven van ongeveer 70 Gy. De score die dit opleverde haalde 4 en 5, waarbij de desquamatie hardnekkig bleef, deze bleef een maand lang zichtbaar. Pas daarna herstelde de bestraalde huid zich om na drie maanden permanent achter te blijven als erytheem.

Dergelijk onderzoek is relevant voor het bepalen van vroege en late huidreacties bij humane brachytherapie (contactbestraling). Vandaar dat er nog steeds experimenten worden gedaan bij varkens die qua huidmorfologie verschillend zijn, met ge-



Ham, de chimpansee die voor NASA in 1961 de Mercury-Redstone 2-testvlucht bemande. Foto: NASA.

bruikmaking van bestralingsisotopen als ^{192}Ir [8]. Hoewel belangrijk voor onderzoek, zijn varkens uit praktische overwegingen lastig te hanteren, ze hebben veel water nodig, houden van modder en kunnen in gevangenschap knorrig, eigennuttig en opstandig zijn.

Apen

Het meest aan de mens verwant zijn de primaten en ook hiermee zijn diverse stralingsproeven verricht. Voor resusaapjes (2,6 kilo) is voor het GI-syndroom gevonden een $LD_{50} = 9,5$ Gy en voor het BM-syndroom $LD_{50} = 5,3$ Gy [5], conform de range die voor mensen wordt gehanteerd.

In Nederland verricht het Biomedical Primate Research Centre (BPRC) in Rijswijk uitgebreid infectieonderzoek waar apen bij zijn betrokken. Tuberculose is een besmettelijke longziekte veroorzaakt door een bacterie waaraan jaarlijks zo'n 1,5 miljoen mensen overlijden. Bij het zoeken naar een vaccin (tegen de multiresistente bacterie) maakt het BPRC gebruik van resusapen. Deze worden geïnfecteerd met de tuberkelbacil (*Mycobacterium tuberculosis*) die zich in de longen ontwikkelt. Uiteenlopende vaccins worden geprobeerd en de situatie van de longen wordt bepaald met een PET-CT. Daarbij wordt ^{18}F FDG als radiotracer benut, een radioactief gelabeld glucose. Afwijkend longweefsel neemt meer ^{18}F FDG op. Het ^{18}F is een positronemitter en met een PET-scanner valt de intensiteit waar



Hermann Muller voor de klas met een groot model van een fruitvliegje (*Drosophila melanogaster*). Foto: Courtesy Lilly Library, Indiana University, Bloomington, Indiana.

te nemen. Door aansluitend een CT-opname te maken valt nauwkeurig de plaats van de ^{18}F FDG in het lichaam te bepalen.

De laatste decennia daalde het aantal apenproeven gestaag, maar die trend zet niet door. Deels omdat onderzoek aan apen veel betrouwbaarder is voor infectieziekten bij de mens dan muisonderzoek en deels doordat de SARS-CoV-2-pandemie het noodzakelijk maakte om vaccins op apen te testen [9].

Het gebruik van mensapen is in Europa verboden, maar elders is dat nog niet het geval. Zo heeft de NASA zich veelvuldig bediend van chimpansees (*Pan troglodytes*) om ruimtevaartlanceringen te testen en na te gaan wat de invloed is van kosmische straling en wat de consequenties zijn van een verblijf in de ruimte [10].

Pig 311

Om op aarde te overleven maakt de mens (*Homo sapiens*) gebruik van andere aardbewoners. Dat vindt plaats in diverse vormen, zo worden dieren of hun producten geconsumeerd, voor de kar gespannen, ingezet om te waken, zoeken ze naar drugs of slachtoffers en zijn geaccepteerd als

gezelschap in huiselijke kring, maar worden ze ook gebruikt als orgaan-donor of er wordt mee geëxperimenteerd. Het dier mag er zijn, is handig en wordt ongevraagd als proefdier aangewend. Een dier heeft geen keus. Soms echter glipt er wel eens een exemplaar door de mazen van het menselijk experiment.

Zo waren de proefdieren bij Operation Crossroads blootgesteld aan de straling van een atoombom. De verwachting was dat geen van de dieren het zou overleven. Dat viel mee, want een van de varkens werd zwemmend in de lagune gevonden. Het dier werd gevangen en naar de Verenigde Staten gestuurd voor een follow-up. Daar groeide ze uit tot een forse zeug (270 kilo), maar bleek onvruchtbaar. Naderhand is twijfel ontstaan over Pig 311. Ze schijnt helemaal niet aan boord te zijn geweest van een van de testschepen. De matrozen zouden het dier op hun observatieboot hebben achtergehouden [11].

Frans Kingma is experimenteel fysicus, stralingsdeskundige en publicist.
www.frans-kingma.com
frans.kingma@live.nl

REFERENTIES

- 1 P. Benecki, 70 Years Ago: A-Bombs Tested on Ships at Bikini Atoll (2016). <https://maritime-executive.com/article/video-bikini-atoll-70-years-later>.
- 2 E.J. Calabrese, Muller's Nobel Prize data: Getting the dose wrong and its significance, *Environmental Research* **176**, 108528 (2019). www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935119303251. Mullers publicatie van 1927, waarvoor hij een Nobelprijs ontving, vermeldde een bestraling van 200.000 keer de achtergrondstraling; een kritische analyse laat zien dat dit een flinke onderschatting is van het gehanteerde dosistempo.
- 3 T. Sangsuwan et al., Transgenerational effects of gamma radiation dose and dose rate on *Drosophila* flies irradiated at an early embryonal stage (2022) <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503523>.
- 4 E.J. Hall en A.J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*, zevende editie (2012).
- 5 H.M. Vriesendorp en D.W. van Bakkum, Susceptibility to total body irradiation, In: J.J. Broerse et al. (eds), *Response to Total Body Irradiation in Different Species* (1984).
- 6 R.C. Thompson, *Life-span Effects of Ionizing Radiation in the Beagle Dog* (1989) http://janus-cloud2.s3.amazonaws.com/www/dog-tissues/reports_broken/red_book.pdf.
- 7 J.F. Fowler et al., Experiments with fractionated x-ray treatment of the skin of pigs, *The British Journal of Radiology* **36**, 188-96 (1963).
- 8 P.C. Hamm et al., Single dose irradiation response of pig skin: a comparison of brachytherapy using a single, high dose rate iridium-192 stepping source with 200 kV X-rays, *The British Journal of Radiology* **73**, 762-70 (2000).
- 9 www.bprc.nl/nl/blog/2020-2022-bprc-de-frontlinie-van-het-covid-19-onderzoek.
- 10 T.M. Hoban-Higgins et al., *Primates in Space Flight* in G. Sonnenfeld (ed) *Experimentation with Animal Models in Space* (2005).
- 11 www.sciencetimes.com/articles/40784/20221102/pig-311-mysteriously-survived-1946-atomic-bomb-test-pacific-atoll.htm.