



- Een onafhankelijke Europese productie, die op internationale schaal opereert.
- Wetenschappelijk georiënteerd om aan U vraag te voldoen.
- Een flexibele houding en een persoonlijke service.
- Een professionele ethische code en een humane behandeling van de dieren.
- ISO 9001:2000 gecertificeerd zorgt voor een gegarandeerd vertrouwen.



Route des Chênes Secs - BP 5
53940 LE GENEST-ST-ISLE - France
Tél. : + 33 (0) 2 43 02 11 91
Fax : + 33 (0) 2 43 02 00 15
E-mail : service.commercial@elevage-janvier.fr
Site-web : www.janvier-breedingcenter.com

Uw vertegenwoordiger in de Benelux :



Bio Services

www.bio-services.nl

info@bio-services.nl

postbus 29 telefoon + 31 (0)413 20 50 30

5400 AA Uden fax + 31 (0)413 20 50 39

Injectie van tumorcellen bij de nude muis: zijn tumorgroei en tumorlocatie afhankelijk van de injectietechniek?

Ilona van den Brink, Geert Poelen, Dorien van de Pol

Centraal Dierenlaboratorium (CDL), afdeling Kleine Dieren, uMC St. Radboud, Nijmegen.

Samenvatting

Een veel voorkomend probleem bij het subcutaan injecteren van tumorcellen bij de muis is vergroeiing van de tumoren van de injectieplaats naar de spier of naar de huid.

Uit onze studie bleek dat afhankelijk van de cellijn de injectiemethode van invloed kan zijn op de plaats waar de tumor zich uiteindelijk bevindt. Ook bleek uit deze studie dat de ongeriefscore wordt beïnvloed door de plaats waar de tumor zich uiteindelijk bevindt.

Inleiding

Dit artikel beschrijft een studie, uitgevoerd in het kader van een stage biotechniek. Er is onderzocht of de manier van injecteren van tumorcellen van invloed is op de groei van de tumoren. Hierbij is gekeken naar de invloed van de naalddikte, het al dan niet toepassen van anesthesie tijdens het injecteren en de invloed van de verschillende eigenschappen van de cellijnen hier op. Het doel van deze studie was de verbetering van de injectiemethode van tumorcellen door te onderzoeken of er een verband bestaat tussen de injectiemethode en de uiteindelijke tumorlocatie.

Injectie van tumorcellen bij muizen wordt al decennia lang toegepast om ondermeer inzicht te krijgen in het groeiedrag van bepaalde tumoren of voor de ontwikkeling van een therapie om tumorgroei te remmen. Daarvoor wordt een celsuspensie subcutaan geïnjecteerd. Na verloop van tijd gaan deze cellen groeien en wordt een tumor gevormd. Om betrouwbaar fundamenteel en/of therapeutisch onderzoek te doen, is de reproduceerbaarheid van de tumorgroei van groot belang. Uit de ervaring van GDL-medewerkers en de literatuur is gebleken dat de groei van deze tumoren afhankelijk is van verschillende factoren. Van belang zijn tumorspecifieke factoren zoals de oorsprong van de tumorcellen en technische factoren zoals de manier waarop de tumorcellen toegediend worden (1,2).

Aanleiding voor deze studie was een kleinschalig experiment van de afdeling Pathologie van het uMC St. Radboud die een indicatie gaf dat de injectiemethode van invloed zou kunnen zijn op de locatie waar de tumor uiteindelijk wordt waargenomen. In onze studie is onderzocht of er een verband bestaat tussen de manier van injecteren en de uiteindelijke tumorlocatie.

Behalve naar de spreiding in tumorlocatie en groeisnelheid werd in deze studie ook gekeken naar het ongerief dat de dieren ten gevolge van deze tumorgroei ondervonden.



de specialist
in
animal bedding



Eén adres voor kwaliteit, continuïteit en service

Tumorgroei

Een probleem dat voorkomt bij subcutane tumorcelinfectie is dat er een spreiding optreedt op de plaats waar de tumor zich gaat vormen. Subcutaan is de ideale groeiplaats voor tumoren ongeacht het soort cellijn, want de tumor heeft daar veel groeimogelijkheden zonder veel ongerief te veroorzaken. In deze studie onderscheiden we de volgende tumorlocaties:

Intradermaal (id): de tumor groeit vast in de huid maar is beweegbaar ten opzichte van de romp.
Subcutaan (sc): de tumor groeit onderhuids en is beweegbaar ten opzichte van de huid en romp.
Musculair (m): de tumor groeit vast aan een spierlaag en de huid is beweegbaar ten opzichte van de tumor.

Tenslotte onderscheiden we nog tumoren die gedeeltelijk intradermaal en gedeeltelijk subcutaan (sc/id) groeien en tumoren die gedeeltelijk subcutaan en gedeeltelijk musculair (sc/m) groeien.

Materiaal en Methoden

Proefopzet

Allereerst is het effect van de anesthesie onderzocht. Het wel of niet gebruiken van anesthesie heeft invloed op de manier waarop de cellen worden geïnjecteerd. Een dier zonder anesthesie wordt gefixeerd in de hand gespoten zodat de huid strak tegen het lichaam aan zit (Afb. 1). Bij een dier onder anesthesie kan de huid met een pincet worden opgetild en kunnen de cellen los onder de huid worden gespoten (Afb. 2).

Uit een pilotstudie, waarbij drie verschillende injectienaalden zijn gebruikt (23G, 25G en 27G) bleken de 23G en de 25G succesvolle injecties op te leveren. De 27G-naald veroorzaakte veel intradermale tumoren en is in dit onderzoek niet meegenomen. Beide naalden zijn in deze studie afzonderlijk getest.

In deze studie is onderzoek gedaan naar drie tumorlijnen: een afkomstig van een niertumor van de muis (RENCA), een muizenmelanoma (MOMEL) en een humaan melanoma (HUMEL). Per tumorlijn werd gebruik gemaakt van 40 mannelijke BALB/c nude muizen van zes tot acht weken oud.



Afbeelding 1. Tumoreninjectie zonder narcose, de muis wordt gefixeerd in de hand zodat de huid strak tegen het lichaam aan zit.



Afbeelding 2. Tumoreninjectie met narcose, de huid wordt met een pincet opgetild en de cellen kunnen los onder de huid worden gespoten.

Helping to make a difference

Research models
Diets & bedding
Technical services
Biological products & services
Project management
Containment solutions

Harlan - Europa's grootste en meest
veelzijdige leverancier van proefdieren.

Dit zijn uitdagende tijden voor de biowetenschappen. De vooruitgang op het gebied van genetica, diagnostiek, weefsel engineering en celtherapie belooft een effectievere behandeling van een breed spectrum aan ziekten en afwijkingen. De ontwikkeling van doeltreffende therapieën vereist zeer veel tijd en moeite.

Bij dergelijke processen kan Harlan een waardevolle partner zijn van wetenschappers en laboranten. Die kunnen zich dan weer volledig op hun research concentreren. Samenwerken in het belang van mensenlevens.

Harlan

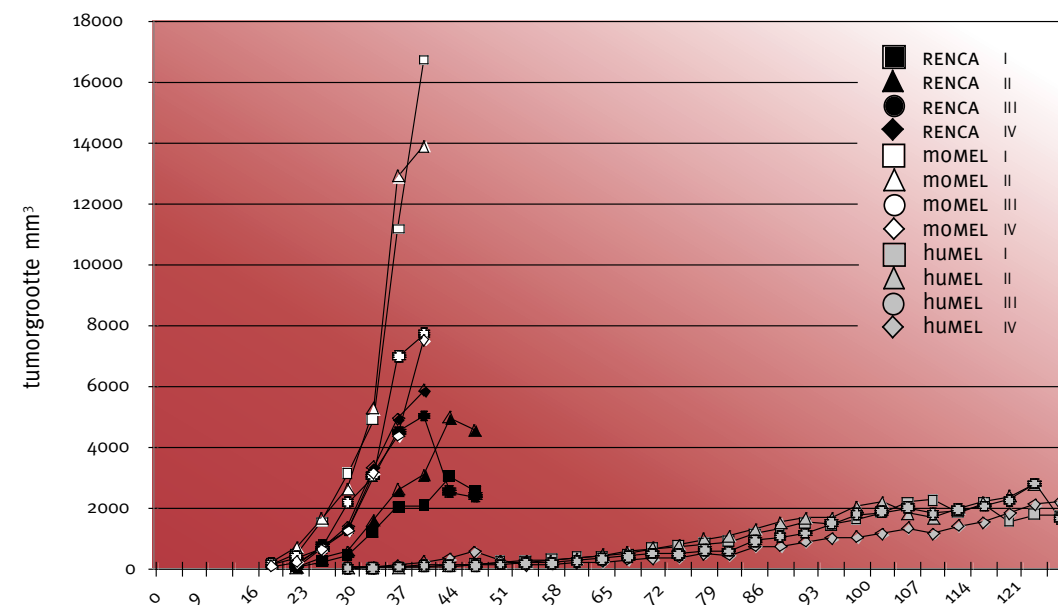
www.harlaneurope.com

Metingen

Tweemaal per week werden de muizen gewogen, de locatie van de tumoren bepaald en het volume van de tumor bepaald door lengte, breedte en hoogte ten opzichte van de muis met een digitale schuifmaat op te meten.

De keuze van het eindpunt is bepaald door de ongeriefscore aan de hand van een lijst van parameters. Met behulp van gepubliceerde richtlijnen (3,4,5) is een ongerief codering opgesteld waar de muizen op gecodeerd werden tijdens het experiment (Tabel 1). Alleen het ongerief ten gevolge van de tumorgroei werd beoordeeld, dus niet het ongerief van het injecteren zelf, het oppakken en eventueel de narcose of andere factoren. Het experiment werd beëindigd aan de hand van de ongeriefcodes.

Afbeelding 3. Tumorgroei
Tumorgrootte per cellijn en methode. I= zonder narcose, naald 25G; II= zonder narcose, naald 23G; III= etheranesthesie, naald 25G; IV= etheranesthesie, naald 23G.



Resultaten

De groeicurven van de verschillende tumorcellijnen tot aan het eindpunt van het experiment zijn weergegeven in afbeelding 3. De groeilocaties van de tumoren van alle drie de cellijnen (aanvankelijk en uiteindelijk) staan vermeld in Tabel 2.

RENCA

De tumoren die ontstaan na injectie met de RENCA-celijn vertonen aanvankelijk de grootste spreiding, de meeste tumoren groeien gedeeltelijk subcutaan en gedeeltelijk intramusculair. Uiteindelijk bevinden de meeste tumoren zich gedeeltelijk intradermaal en gedeeltelijk subcutaan. Opvallend is dat er geen tumor subcutaan is blijven groeien, terwijl er aanvankelijk toch ruim 25% subcutaan zat.

Access to excellence

Injectiemethode

Het injectieoppervlak werd schoongemaakt met 70% ethanol. Na het opzuigen van de cellen werd de naald schoongemaakt met 70% ethanol, zodat de buitenkant van naald schoon was en er geen cellen in de huid zouden blijven steken. Per injectie werd 0,1 ml celsuspensie gebruikt (RENCA: 1.107 cellen/ml, MOMEL: 1.106 cellen/ml en HUMEL: 2,5.107 cellen/ml). Alle dieren werden subcutaan in de rechterflank geïnjecteerd.

methode I: injectie zonder narcose met een 25G-naald (muizen 1 t/m 10).

methode II: injectie zonder narcose met een 23G-naald (muizen 11 t/m 20).

methode III: injectie onder etheranesthesie* met een 25G-naald (muizen 21 t/m 30).

methode IV: injectie onder etheranesthesie met een 23G-naald (muizen 31 t/m 40).

* Deze experimenten zijn uitgevoerd in 2000 en ether is inmiddels vervangen door isofluraan. Tijdens het overstappen zijn er geen problemen geconstateerd bij de muizen of bij de cellijnen.

Tabel 1. Ongerief codering

geen ongerief, code 0

hieronder vallen de dieren die qua uiterlijk en gedrag normaal functioneren; zij hebben wel een tumor

gering ongerief, code 1

uiterlijk	geringe neus en oog uitvloeiing, verminderd gewicht
gedrag	verzwakt maar reageert wel normaal op de omgeving, d.w.z hij is nieuwsgierig, wast zich gewoon en is actief met anderen, heeft geen stress of agressie verschijnselen
locomotie	de bewegingen zijn normaal, de tumor belemmert de gang niet
fysiologie	normale ademhaling, geen rillingen of stuiptrekkingen, geen zelfbeschadiging, normale temperatuur
houding	is normaal, zit niet in een hoekje, is niet uitgeput
vocalisatie	geen pijnuitingen, niet pieperig

matig ongerief, code 2

uiterlijk	neus- en ooguitvloeiing, verminderd gewicht, tumor begint te necrotiseren maar is nog wel dicht, dieren kunnen er ook bleek uitzien
gedrag	de reactie vermindert vooral bij uitlokking van andere dieren, heeft verder wel periodes van normaal gedrag, geen stress of agressie verschijnselen
locomotie	de bewegingen zijn redelijk normaal, tumor kan soms dwars zitten.
fysiologie	normale ademhaling, af en toe trillingen, soms stuiptrekkingen, geen zelfbeschadiging, de temperatuur kan iets verlaagd of verhoogd zijn
houding	muis zit af en toe in elkaar
vocalisatie	kan af en toe pieperig zijn

ernstig ongerief, code 3

uiterlijk	blijvende neus- en ooguitvloeiing, sterke vermagering, tumor is genecrotiseerd en is open gegaan.
gedrag	geen reactie op uitlokkingen of omgeving, dieren gaan zich afzonderen, doen niet meer aan zelfverzorging en eten en drinken bijna niet meer
locomotie	bewegen amper, hebben zeer wankele gang
fysiologie	moeite met ademen, trillingen, stuiptrekkingen, zelfbeschadiging vooral aan aangetaste plek, dieren hebben een abnormale temperatuur ze zijn onderkoelt of hebben koorts
houding	dieren zitten in elkaar met een bolle rug
vocalisatie	dieren piepen voortdurend, laten stress, pijn en agressiviteit zien

zeer ernstig ongerief, code 4

hieronder vallen vooral de dieren die tijdens het onderzoek dood zijn gegaan, aan bijvoorbeeld een tumor die is open gegaan waar het dier aan is dood gebloed.

Tabel 2. Localisatie van tumoren na subcutane injectie via 23 of 25G-naalden bij wel en niet geanestheerde muizen.

	Aanvankelijke aantal tumoren per locatie						Uiteindelijke aantaltumoren per locatie					χ^2	kritische waarde
	n	ID	ID/SC	SC	SC/M	M	ID	ID/SC	SC	SC/M	M		
RENCA													
I; zonder narcose, 25G	10	0	2	3	3	2	0	3	0	4	3		
II; zonder narcose, 23G	10	0	1	0	3	6	0	3	0	1	6		
III; met narcose, 25G	10	1	2	5	2	0	3	6	0	0	1		
IV; met narcose, 23G	10	0	2	3	5	0	1	6	0	1	2		
		1	7	11	13	8	4	18	0	6	12	18,7	21,0
MOMEL													
I; zonder narcose, 25G	10	0	4	4	0	2	2	4	2	0	2		
II; zonder narcose, 23G	10	1	0	8	0	1	2	5	3	0	0		
III; met narcose, 25G	10	2	1	7	0	0	2	5	3	0	0		
IV; met narcose, 23G	10	3	2	5	0	0	1	7	2	0	0		
		6	7	24	0	3	7	21	10	0	2	7,8	21,0
HUMEL													
I; zonder narcose, 25G	10	0	0	10	0	0	1	2	2	1	4		
II; zonder narcose, 23G	10	0	1	9	0	0	5	0	0	0	5		
III; met narcose, 25G	10	3	2	5	0	0	6	2	2	0	0		
IV; met narcose, 23G	9	0	0	9	0	0	9	0	0	0	0		
		3	3	33	0	0	21	4	4	1	9	26,5	21,0

χ^2 is berekend als $(Oij-Eij)^2/Eij$ waarbij Oij=waargenomen aantal en Eij=verwachte aantal. Eij is berekend door rijtotaal*kolomtotaal/totale aantal. De kritische waarde geeft aan de minimum waarde voor χ^2 bij P=0,05 waarbij er een samenhang is tussen de gegevens. Of anders gezegd: wanneer χ^2 groter is dan de kritische waarde dan is de kans dat dit berust op toeval kleiner dan 5%.

Als we kijken naar de invloed van wel of geen anesthesie op deze resultaten dan blijkt dat zowel in de aanvankelijke groep als in de uiteindelijke groep een statistisch verschil is geconstateerd. Als we naar de resultaten uiteindelijk gaan kijken blijkt dat in de groep zonder narcose 45% intramusculair zit. In de groep gespoten met narcose zit het merendeel in de groep gedeeltelijk subcutaan en gedeeltelijk intradermaal (60%). Als we gaan kijken naar het verschil in gebruik van de twee verschillende naalden blijkt dat er geen statistische significantie is te zien.

HUMEL

Na injectie met de tumorcellen van de cellijn HUMEL groeien de meeste tumoren (85%) subcutaan. Uiteindelijk bevonden zich de meeste tumoren (54%) intradermaal. Als we kijken naar de invloed van het gebruik van anesthesie op dit groeigedrag is er een statistisch verschil waar te nemen. De groep zonder narcose blijkt meer subcutane tumoren op te leveren dan met narcose. Helaas gaan de tumoren in een later stadium wel vergroeiën, in beide groepen komt het grootste deel uiteindelijk intradermaal te zitten. Als we kijken naar de invloeden van de twee verschillende naalden is daar ook een significantie zichtbaar. Bij de 23G-groep bleken meer subcutane tumoren te ontstaan dan de 25G-naald. Ook in deze groepen gingen de tumoren uiteindelijk vergroeiën. Wat wel op viel was dat de tumoren in de groep 23G intradermaal of musculair vergroeide terwijl bij de groep 25G de tumoren vergroeide over alle mogelijke locaties.

MoMEL

Als de tumoren gaan groeien blijken ze wel te gaan vergroeien. Aanvankelijk zat 60% van alle tumoren subcutaan en uiteindelijk bleef daar maar 10% van over. Als we kijken naar de invloed van wel of geen anesthesie en het verschil tussen de twee naalden blijkt er geen duidelijke statistische significantie gevonden te zijn.

Discussie

Groei

De drie tumorlijnen hebben verschillende eigenschappen en groeiedragingen. Belangrijk voor de studies is dat er weinig spreiding in groeilocatie zit. De manier van injecteren zou kunnen helpen de spreiding te beperken, maar is wel afhankelijk van het soort cellijn. De manier van injecteren lijkt het meeste van invloed te zijn bij de humane melanoma-celijn. Dit zou kunnen komen doordat het een langzame groeier is. De muizen melanoma-celijn is een snelle groeier en daar is helemaal geen statistische significantie in de groepen gevonden.

Locatie/ongerief

Gebleken is wel dat de uiteindelijke groeilocatie van invloed is op het ongerief van de dieren.

Tumoren die intradermaal groeien, veroorzaken het meeste ongerief. Een verklaring hiervoor is dat deze tumoren in de huid te weinig groeiruimte hebben waardoor de tumoren openbarsten en necrotiseren.

De richtlijnen in *De code of practice ten behoeve van het kankeronderzoek (COP)* gaat bij de keuze van het eindpunt uit van een aantal criteria. Deze zijn: een ernstige achteruitgang in conditie, de totale tumormassa, ernstige klinische symptomen of de voorspelbaarheid dat op basis van voorgenoemde of andere parameters het dier op korte termijn dood zal gaan. Al deze parameters zijn opgenomen in de ongeriefcoderingslijst die in deze studie werd gehanteerd. In de COP wordt ook een tumorgrootte van 2 cm³ als eindpunt gehanteerd. Omdat de tumoren die ontstaan na injectie met de RENCA-celijn bij deze grootte nog niet metastaseren, en dat is voor het onderzoek dat de afdeling Pathologie uitvoert naar deze tumoren wel van belang, is in deze studie afgeweken van deze COP. Tijdens deze studie zijn tumoren waargenomen die aanzienlijk groter waren dan 2 cm³. Uit onze waarnemingen bleek echter dat de locatie van de tumor een grotere invloed op de ongeriefscore gaf dan de omvang van de tumor. Ernstig en zeer ernstig ongerief (code 4 of hoger) zijn in deze studie niet waargenomen bij tumoren die zich subcutaan of subcutaan/musculair bevonden. Bij de andere drie locaties scoorde 25% een ongeriefcode van 4 of hoger. Minder spreiding in de uiteindelijke groeilocatie hoeft dus niet altijd positief te zijn. De verminderde spreiding bij de humane melanoma-celijn houdt in dat 78,9% intradermaal gaat groeien. Intradermale tumoren zorgen over het algemeen voor meer ongerief en meer uitval. Waarschijnlijk kun je dan beter kiezen voor een methode met meer spreiding maar met minder ongerief.

Conclusie

Deze studie toont aan dat de methode die wordt gebruikt om de tumorcellen te injecteren niet van invloed is op de groeisnelheid en tumorgrootte. De tumorgroei wordt bepaald door eigenschappen van de tumorcellen zelf.

De injectiemethode kan afhankelijk van de celijn van invloed zijn op de uiteindelijke locatie van de tumor. Alleen bij de humane melanoma-celijn en de RENCA blijkt een zeker verband te bestaan tussen de verdeling van de tumorlocaties en gebruikte injectiemethode. Met de resultaten van deze studie kan geen verband worden aangetoond tussen respectievelijk de injectiemethode of de celijn en de mate van ongerief. Wel is er een sterke relatie gevonden tussen de locatie van de tumor en de mate van ongerief.

Samengevat: bij sommige cellijnen zou de manier van injecteren van invloed kunnen zijn op de uiteindelijke groeilocatie en hiermee dus ook op de

spreading, het ongerief en de uitval. Per tumorlijn zou gekeken moeten worden wat de optimale injectiemethode is. Verder onderzoek naar deze vraagstelling zou in de toekomst mogelijk uitval van muizen in tumorenonderzoek kunnen verminderen. Als de groei van de tumoren bij te sturen is door de manier van injecteren kan dat minder spreiding en ongerief en dus minder uitval opleveren.

Literatuur

- 1 Khlief, S.N., Curt, G.N., *Animal Tumor Models*. Cancer Medicine, 5th edition 2000
- 2 Fidler, I.J., *Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis*. Cancer and Metastasis Reviews 1986, 5:29-49
- 3 FELASA Working Group on Pain and Distress. Baumans, V., Brain, P.F., Brugere, H., *Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs*. Laboratory Animals 1994; 28:97-112
- 4 Jones, H.R.P., Oates, J., Trussel, B.A., *An applied approach to the assessment of severity. Humane endpoints in animal experiments for biomedical research* 1998, 40-47
- 5 *Code of Practice dierproeven in het kankeronderzoek*. Inspectie W&V, juli 1999.

All it takes to operate

B | BRAUN
AESCULAP

- Aesculap instrumentarium
- Hechtmateriaal en wondverzorging
- Desinfectie, hygiëne en overige bescherming
- Spuiten, naalden, I.V. canules en infuuspompen
- Producten voor bereiding en toediening infusie vloeistoffen
- Water voor injectie en andere infusie vloeistoffen in diverse presentaties

Bio Services
www.bio-services.nl

Bio Services is uw dealer voor een groot assortiment B. Braun producten

hechtdraad voor alle diersoorten

MÜLLER Micro-Instruments

hechtapparaat voor alle diersoorten

Eén adres voor kwaliteit, continuïteit en service

Postbus 29 5400 AA Uden
T +31 (0) 413 20 50 30 F +31 (0) 413 20 50 39
E info@bio-services.nl