

**A.A. te Velde** Tytgat Instituut voor Darm en Lever Onderzoek, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam  
**M. Bol-Schoenmakers** IRAS, afdeling Immunotoxicologie, Universiteit Utrecht, Utrecht  
**M. Duijvestein** Afdeling Gastroenterologie en Hepatologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden  
**B. Kremer** TNO Kwaliteit van Leven, Leiden  
**E.M.J. van der Logt** Afdeling Gastroenterologie en Hepatologie, Universitair Medisch Centrum Groningen  
**R.E. Mebius** Moleculaire Celbiologie en Immunologie, Vrije Universiteit Medisch Centrum, Amsterdam  
**J.N. Samsom** Laboratorium voor Pediatrische Gastroenterologie, Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam  
dr Anje A. te Velde, Tytgat Instituut voor Darm en Lever Onderzoek, AMC,  
S2-176, Meibergdreef 69-71, 1105 BK Amsterdam 020 5668060; a.a.tevelde@amc.uva.nl

# Diermodellen voor het bestuderen van chronische darmontsteking

In Nederland werkt een aantal verschillende onderzoeksgroepen aan ontstekingsziekten in de darm. Voor dit onderzoek wordt geregeld gebruik gemaakt van diermodellen. In het voorjaar van 2009 zijn deze groepen bijeen gekomen om te spreken over het optimaliseren van de verschillende modellen om zo tot een verfijning van deze dierproeven te komen.

## Inleiding

Diermodellen zijn van groot belang voor het onderzoek naar het ontstaan, de karakterisatie en de therapie van chronische darmontstekingen. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de ziekte van Crohn en *colitis ulcerosa*. Hoewel er veel overlap is bij deze twee ziektes zijn er klinisch en genetisch wel verschillen. Bij *colitis ulcerosa* is alleen de dikke darm aangetast en ook alleen het oppervlak van het slijmvlies. Bij de ziekte van Crohn kan van mond tot anus het slijmvlies van de darm ontstoken zijn. Bovendien kunnen alle lagen van de darmwand betrokken zijn. De genetische verschillen komen tot uiting doordat er specifieke mutaties zijn beschreven in patiënten met de ziekte van Crohn, die niet bij *colitis ulcerosa* worden gevonden en omgekeerd.

Hoe de ziekten ontstaan is nog grotendeels onduidelijk. Wat we weten komt vooral uit onderzoek aan diermodellen voor deze ziekten. De mogelijke oorzaak is een combinatie van genetische gevoeligheid, een veranderde immunologische respons tegen de aanwezige darmflora en omgevingsfactoren.

**Het onderzoek naar chronische darmontsteking heeft een jaar of tien geleden een grote vlucht genomen, omdat vanaf die tijd een groot aantal transgene en knockout-muisstammen werden gegenereerd. Mutaties in en deleties van genen betrokken bij de regulatie van de immunologische respons gaven vaak als eerste symptoom een ontsteking van de darm te zien. Dit is verklaarbaar, doordat in de darmen een zeer delicaat evenwicht aanwezig is tussen het niet reageren op de aanwezige darmflora en voedselbestanddelen en het wel reageren op potentiële pathogenen. Bij de geringste verstoring kan een darmontsteking ontstaan.**

#### Waarom diermodellen voor het bestuderen van chronische darmontsteking?

Mensen hebben een complexe en zeer individuele genetische achtergrond en microflora in de darm. Het ziekteverloop en de medicatie verschillen van patiënt tot patiënt. Klinische trials om naar de effectiviteit van geneesmiddelen tegen deze ziekten moeten dan ook groot opgezet worden en dan nog kan maar een beperkt aantal zaken worden onderzocht. De huidige therapieën blijken succesvol in slechts een beperkt percentage van de patiënten en kunnen behoorlijke bijwerkingen geven. Met behulp van diermodellen kan inzicht worden verkregen in het complexe ziekteverloop en kan worden gezocht naar nieuwe therapeutische targets.

Hoewel de verschillende diermodellen, die voor dit onderzoek voorhanden zijn alle voor- en nadelen hebben, hebben we de afgelopen jaren veel geleerd over deze ziektes. Basale immunologische principes en belangrijke cellulaire processen blijken bij mensen en muizen sterk overeen te komen. Daarom kunnen we met behulp van muizenmodellen veel te weten komen over chronische darmontsteking.

#### Waarom moet een goed diermodel voor een chronische darmontsteking voldoen?

Een goed diermodel voor experimentele colitis, zoals we de chronische darmontsteking in een diermodel noemen, moet op een reproduceerbare manier een ontsteking in de darm geven. Dit houdt in dat er een ontsteking in de darm wordt opgewekt, waarbij de dieren een veranderde ontlasting krijgen en mogelijk ook gewichtsverlies. De histopathologie moet gelijken op die bij patiënten met de ziekte van Crohn of *colitis ulcerosa*.

## Welke muizenmodellen zijn er?

Er kan onderscheid gemaakt worden in vier soorten modellen voor experimentele colitis. Allereerst zijn er muizenstammen, die spontaan een colitis krijgen. Dan zijn er muizen waarin door een deletie van een gen of door introductie van een transgen colitis wordt geïnduceerd. Verder zijn er chemische stoffen die een colitis kunnen veroorzaken en ten slotte kan het overbrengen van bepaalde celpopulaties van een gezonde muis naar een immuundeficiënte muis een verstoring van het evenwicht in het darmimmuunsysteem en een colitis induceren. In tabel 1 staan van alle vier modellen één of meerdere voorbeelden.

Tabel 1. Voorbeelden van de vier groepen modellen van experimentele colitis.

Colitis model:	voorbeeld:
Spontane colitis	in SAMP/Yit-muizen
Deletie van een gen of door introductie van een transgen	<i>Il-10</i> <sup>-/-</sup> , <i>Gai2</i> <sup>-/-</sup> muizen
Inductie door toedienen van een chemische stof	TNBS, DSS colitis
Overbrengen van celpopulaties van een gezonde muis naar een immuundeficiënte muis	CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>high</sup> transfer in SCID of <i>Rag</i> <sup>-/-</sup> muizen

De meest gebruikte modellen zijn de inductie van een colitis door TNBS (trinitrobenzeensulfonzuur) en DSS (dextraan-natriumsulfaat). TNBS wordt rectaal gegeven of op de huid aangebracht om de muis te sensibiliseren. TNBS bindt aan eiwitten, waardoor een verandering optreedt die een immunologische reactie als gevolg heeft. Na ongeveer een week wordt er een overgevoeligheidsreactie opgewekt door nog een keer TNBS intrarectaal te geven. Muizen krijgen dan na ongeveer 48 uur een colitis, die immunologisch het meest lijkt op de ziekte van Crohn (zie Afb. 1). Bij DSS wordt gedurende een week een percentage DSS in het drinkwater toegevoegd. DSS is een macromolecuul dat ervoor zorgt dat de mucusbarrière in de darm verstoord raakt. De cellen in de darm komen zo in aanraking met darmbacteriën. Muizen krijgen een colitis in het laatste deel van hun dikke darm, die het meeste lijkt op *colitis ulcerosa* (zie Afb. 2).

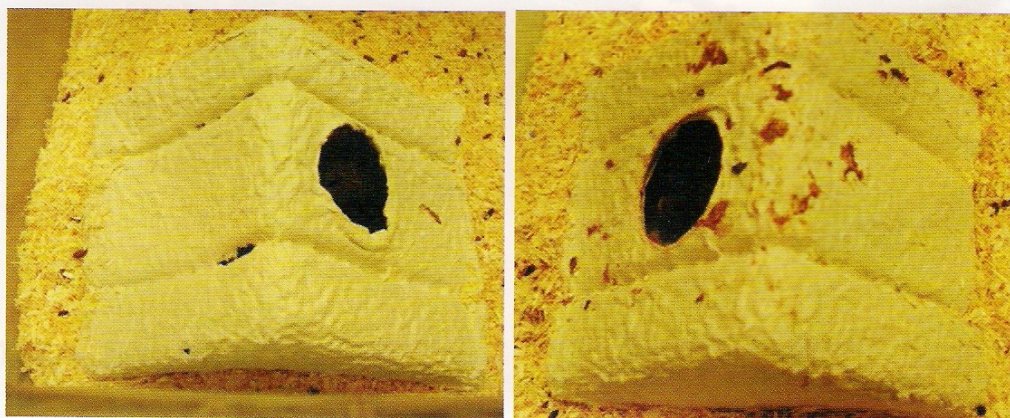
Beide exogeen geïnduceerde colitismodellen duren meestal maximaal tien dagen, waardoor deze eigenlijk geen chronische colitis reflecteren. Daarom worden deze stoffen ook wel meermaals gegeven met intervallen voor kort herstel tussen de doses.

In 2006 hebben wij onderzocht hoe onderzoeksgroepen uit de hele wereld in het jaar ervoor het model van TNBS-colitis hadden uitgevoerd. Tot onze verbazing bleek dat van de 20 onderzoeken er geen enkele op dezelfde manier uitgevoerd was. Iedere groep



*Afbeelding 1. Macroscopisch beeld van een colon en milt van een controle muis (boven) en van een muis twee dagen na toediening van de tweede maal TNBS intrarectaal (onder).*

*Afbeelding 2. Kooien van muizen met en zonder DSS in het drinkwater. Aan de RES DES-huisjes is te zien dat de muizen met DSS in het drinkwater als gevolg van een colitis diarree krijgen. De foto's zijn genomen op de zevende dag na het starten van de toediening van DSS.*



	AMC	Erasmus MC	TNO Leiden	UU
TNBS				
bron TNBS	Sigma	Sigma	Sigma	Sigma
toediening	rectaal	1 <sup>ste</sup> keer huid 2 <sup>de</sup> keer rectaal	1 <sup>ste</sup> keer huid 2 <sup>de</sup> keer rectaal	1 <sup>ste</sup> keer huid 2 <sup>de</sup> keer rectaal
% ethanol rectaal	40	50	40	40
dosis TNBS	1,5-2 mg/100µl	2,5 mg/100µl	1,0 mg/100µl	1,0 mg/100µl
katheter rectaal	Abbocath T22G	BD 427421	Unomedical	Abbocath T22G
muizen				
bron	Harlan (NL), Charles River (Duitsland) of eigen fok	Charles River of eigen fok	Harlan, Gannath, Frankrijk	Charles River Duitsland
stam	C57Bl/6NCrI of BALB/cOlaHsd	BALB/c of Background fok	SJL/JHan <sup>tm</sup> Hsd	BALB/c of cAnNCrIbr
microbiële status van de muizenkolonie conform FELASA lijst: positief getest voor:	entamoeben, Trichomonas, Tritrichomonas, Helicobacter, Pasteurella	niets	niets	entamoeben, Trichomonas, Tritrichomonas, Pasteurellaceae
aantal per kooi	5 tot 7	2 tot 4	max 6	5 tot 10
geslacht	vrouw	vrouw/man	vrouw	vrouw
leeftijd wk	8-10	<10	10-12	10-12
acclimatiseren	1 week	1 week	2 weken	2-3 weken
voer	CRME van SDS	CRM(P) van SDS	R/N-H van SSNIFF	CRME van SDS
drinken	leidingwater pH 2.7(HCl)	leidingwater pH 2.7(HCl)	leidingwater pH 2.7(HCl)	leidingwater pH 2.7(HCl)
bedding	vurenhout Lignocel	Lignocel 8/15	Sparrenhout, Lignocel 9S Technilab BMI BV, Someren, NL	Espen (ABEDD)
filtertop/ivc	nee	nee	nee	ja
kooiverrijking	rES DES huisjes en tissues	tissues	Enviro-Dry	tissues
andere maatregelen	nee	evt gelpakjes met vocht	nee	nat voer

Tabel 2. Uitvoering van TNBS-colitis in een aantal laboratoria in Nederland.

heeft kennelijk een eigen manier om TNBS-colitis te induceren. De verschillen betreffen de gebruikte muizenstam, de leeftijd van de muizen, de hoeveelheid TNBS en de duur van de proef (1). Tijdens informele gesprekken met collega's bleek dat ook in Nederland geen consensus bestond over dit model. TNBS-colitis wordt samen met DSS-colitis het meest toegepast in Nederland. Daarom werd in het voorjaar van 2009 een bijeenkomst georganiseerd waarin beide modellen werden besproken.

#### Hoe worden TNBS- en DSS-colitis in Nederland uitgevoerd?

Tijdens de bijeenkomst zijn de verschillende variatiebronnen in de dierproeven doorgenomen. Dit resulteerde in een lijst van mogelijke bronnen van variatie: de gegevens zijn na afloop van de bespreking door de laboratoria ingevuld. Gegevens over de TNBS- en DSS-toediening, de muizen, opzet van experimenten, de te bepalen parameters en de faciliteit waarin de muizen worden gehouden werden hierin verwerkt. In tabel 2 en 3 worden in een overzicht de verschillen tussen diverse Nederlandse onderzoeksgroepen in proefopzet (het toedienen van TNBS en DSS) en de huisvestingsomstandigheden van de muizen samengevat.

Uit de gegevens in deze tabellen blijkt dat er veel verschil is in de wijze waarop de twee modellen worden uitgevoerd. In een recente bijeenkomst (23 april 2010) werden deze verschillen worden besproken. Alle groepen werden uitgenodigd om aan te geven welke experimenten met de modellen worden uitgevoerd en de resultaten die met de modellen worden verkregen zullen worden bestudeerd. Het lijkt heel goed mogelijk dat specifieke omstandigheden nodig zijn voor het bereiken van een optimaal resultaat.

Door op deze manier de experimenten naast elkaar te leggen en uit te zoeken wat de beste omstandigheden zijn voor de verschillende colitismodellen hopen we tot een verfijning te komen van deze dierproeven. Als vervolg op deze inventarisatie zullen in een aantal laboratoria standaardproefopzetten met elkaar vergeleken worden. Hierover zal in de toekomst worden gerapporteerd.

Speciale dank aan dr H. van Herck voor overleg en het kritisch lezen van het manuscript.

#### Literatuur

- 1 Te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW (2006) *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. *Inflam Bowel Diseases* 12: 995-9