

Een muismodel voor de huidziekte epidermolysis bullosa



Andrea Graver-Huurman

Centrale Dienst Proefdieren UMC Groningen, e-mail: a.graver@umcg.nl

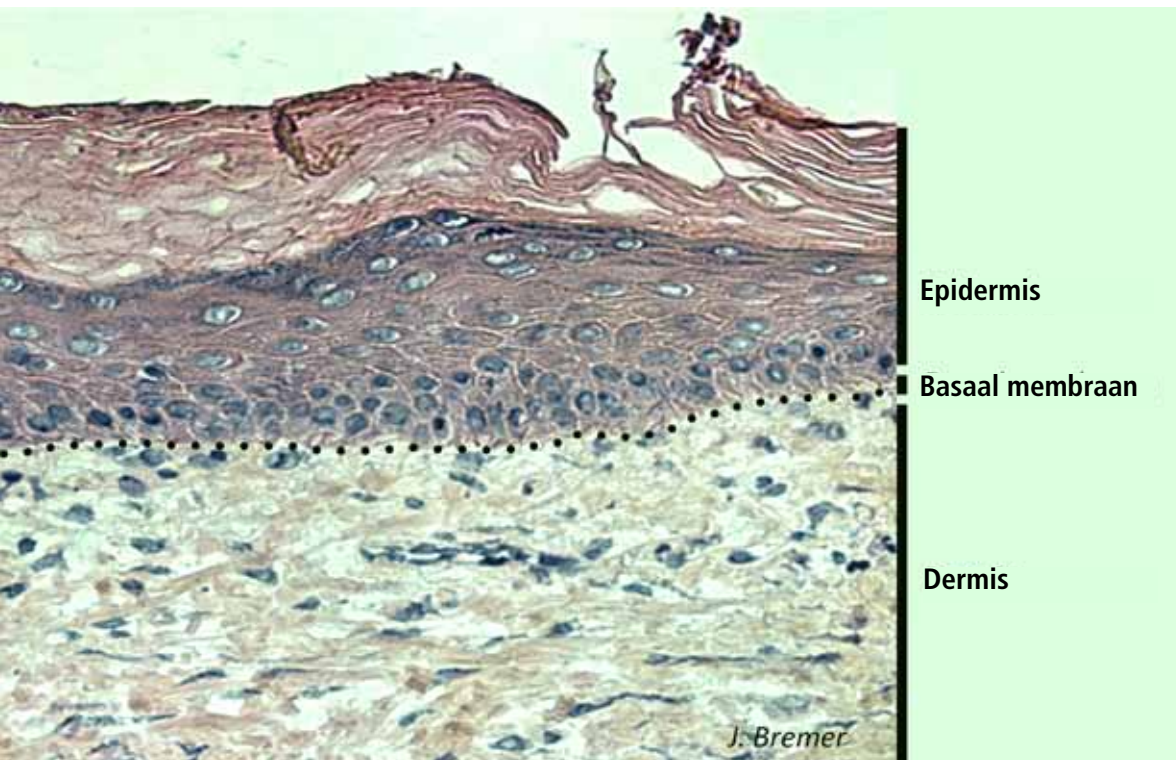
Hoe het begrip van een experimenteel model het welzijn van de proefdieren kan bevorderen.

Inleiding

Als biotechnisch medewerkster van de centrale dienst proefdieren (CDP) van het universitair medisch centrum Groningen ben ik onder andere werkzaam bij de individual ventilated cage (IVC) unit waar muizen worden gehuisvest die op dat moment in experiment zijn. De muizen die in onze IVC unit gehuisvest worden, hebben een immuundeficiëntie en worden in deze unit beschermd tegen micro-organismen. Ik ben verantwoordelijk voor de dagelijkse verzorging van de dieren en het reilen en zeilen eromheen.

Binnen deze IVC unit zijn veel kort- en langlopende experimenten waarbij de muizen een uiteenlopende mate van ongerief ondervinden. Als biotechnisch medewerkster van deze afdeling merk ik ongerief vaak vroegtijdig op en kan ik de desbetreffende onderzoeker zo snel mogelijk inschakelen om onnodig ongerief te voorkomen, of waar nodig zelf actie ondernemen. Ik heb ontdekt dat ik, door mij te verdiepen in het onderzoek, de welzijnsbewaking beter kan uitvoeren.

Het doel van dit verhaal is te laten zien dat je door kennis over het onderzoek op te doen snel en adequaat kan reageren op het ongerief bij proefdieren. Als ondersteuning van mijn verhaal beschrijf ik een onderzoek naar de ernstige huidziekte epidermolysis bullosa (EB). Ik begin met een beschrijving van de ziekte en het onderzoek. Vervolgens vertel ik over de verzorging, huisvesting en welzijnsbewaking. Tevens belicht ik hoe ik mijn kennis heb kunnen toepassen bij de welzijnsbewaking van de proefdieren. De onderzoeker Jeroen Bremer, promovendus bij de onderzoeksgroep dermatologie, heeft mij hierbij ondersteund door informatie te verschaffen over de ziekte en het onderzoek. Naast mijn werkzaamheden bij de Centrale Dienst Proefdieren ben ik lid van de commissie communicatie van de Biotechnische Vereniging. »



Afbeelding 1. Haematoxyline-eosine kleuring op gereconstrueerde huid. Een HE kleuring op huid laat de epidermis en dermis zien. De epidermis is donkerpaars van kleur, de dermis is lichter van kleur. De celkernen zijn donkerblauw.

Wat is epidermolysis bullosa?

Om de ziekte EB te begrijpen zal ik eerst uitleggen hoe de huid is opgebouwd. De huid bestaat grofweg uit twee lagen; de epidermis, ook wel opperhuid genoemd, en de dermis, ook wel lederhuid genoemd. De epidermis is de buitenste laag van de huid, de laag die je ziet als je naar je huid kijkt. Onder deze buitenste laag zit de dermis. De dermis bevat veel bindweefsel, haarzakjes, zweetklieren, bloedvaten en vetweefsel. Daarom is deze laag ook verreweg de dikste van de twee. De epidermis en dermis zijn aan elkaar verbonden met een zogeheten basaal membraan (afb. 1). Dit membraan bestaat uit ketens van eiwitten die aan elkaar hechten. Bij EB is er een defect in één of meerdere van deze eiwitten en laat de epidermis los van de dermis en ontstaan er blaren. Vandaar de naam epidermolysis (loslating van de epidermis) bullosa (blaarvorming). Er zijn tot nu toe achttien genen bekend waarin genetische afwijkingen, ook wel mutaties genoemd, EB kunnen veroorzaken. Omdat er zoveel genen betrokken zijn bij de ziekte en de locatie van de eiwitten verspreid zitten in de huid is er een grote diversiteit van het ziektebeeld. De ernst van de aandoening kan verschillen van mild tot zeer ernstig. Bij een milde variant beperkt de blaarvorming zich tot de handen en voeten. Bij een ernstige vorm ontstaan blaren over het hele lichaam. Omdat huid van EB patiënten zo fragiel is, worden kinderen met EB ook wel vlinderkinderen genoemd. Momenteel bestaat er nog geen therapie voor EB en is de behandeling gericht op intensieve pijnbestrijding en verzorging van de wonden.

Doel van het onderzoek

Het doel van dit onderzoek is het bestuderen van een mogelijk therapie voor dystrofische epidermolysis bullosa (DEB), een variant van EB. Het idee achter deze therapie is dat het defect in

het eiwit die deze ziekte veroorzaakt wordt overgeslagen, waardoor het uiteindelijke eiwit iets korter wordt, maar wel functioneel. Deze therapeutische toepassing wordt in een aantal ziektes al toegepast, waaronder Duchenne spierdystrofie. In vitro resultaten laten zien dat deze toepassing waarschijnlijk geschikt zal zijn voor DEB. Voordat deze toepassing getest kan worden op een patiënt zal verder in vivo onderzoek moeten uitwijzen of het toepasbaar is. Om het effect van de therapie te testen is een diermodel nodig waarbij de onderzoeker een stukje humane huid op de rug van de muis wil behandelen. Het onderzoek bestaat uit twee delen. Het eerste deel betreft de opzet van het diermodel en het tweede deel de daadwerkelijke toepassing van de therapie door middel van subcutane injecties.

Het onderzoek

Opzet van het muismodel

Het diermodel dat voor deze studie gebruikt wordt, is gebaseerd op de cell-sorting eigenschap van huidcellen. De fibroblasten (dermiscellen) en keratinocyten (epidermiscellen) hebben de eigenschap zichzelf, in vivo, te sorteren tot de structuur van normale huid. Op deze manier kunnen primaire, in vitro gekweekte cellen, worden getransplanteerd op de rug van de muis. Hier zullen de cellen een humane huidstructuur vormen en is een volledige huidtransplantatie niet nodig.

Om de cellen op de rug van de muis te laten groeien worden transplantatie kamers gebruikt. Deze siliconen kamers houden de muizenhuid opzij zodat de cellen kunnen vasthechten op de spiervlak op de rug van de muis. De transplantatie kamers vormen een lucht-vloeistof systeem dat nodig is voor de ontwikkeling van huid.

Er worden Athymische naakte muizen (CrI:NU(NCr)-Foxn1nu) van ongeveer 12 weken oud gebruikt waarin de transplantatiekamers worden geïmplant. In deze muizen worden geen T-cellen (afweercellen) gemaakt door de afwezigheid van de thymus. Door het ontbreken van deze T-cellen is de muis immuundeficiënt en zal de muis niet in staat zijn om het transplantaat af te stoten.

Procedure

De muizen worden geanestheiseerd met isofluraan (3-5% inductie en 1,5-3% onderhoud) en als pijnbestrijding wordt voorafgaande aan de operatie 0,10 – 0,15 mg/kg buprenorfine toegediend. Omdat het hier naakte muizen betreft is scheren niet nodig en wordt pre-operatief de huid alleen gedesinfecteerd met chloorhexidine en gespoeld met steriele zoutoplossing. Om de transplantatiekamer te kunnen plaatsen op het spiervlak wordt een excisie gemaakt van een rond stukje huid (7-9 mm in diameter). Het transplantatiebed wordt gemaakt craniaal op eenderde van de rug van de muis (afb. 2A). De huid wordt geprepareerd en de 12mm grote transplantatie kamer wordt door middel van de fixatie tussen de huidlaag en de spiervlak geplaatst. Als het nodig is kan de transplantatiekamer gefixeerd worden met enkele hechtingen. De transplantatiekamer heeft kleine openingen waardoor, direct na de plaatsing, de suspensie van humane huidcellen wordt geïnjecteerd (afb. 2B). Omdat de cellen de kans moeten krijgen zich te hechten op het spiervlak wordt de muis in een anesthesiebox geplaatst alwaar de muis nog 30 tot 45 minuten onder lichte verdoving blijft. Daarna wordt de recovery ingezet. Terwijl de muis in de anesthesiebox verblijft worden de andere muizen geopereerd. Als de muis goed is bijgekomen wordt hij terug geplaatst in zijn IVC kooi. Als post-operatieve pijnbestrijding wordt de eerste 48 uur, om de acht uur een subcutane injectie met buprenorfine gegeven (0,10 – 0,15 ml/kg). De subcutane injectie wordt onder anesthesie gegeven omdat fixeren onmogelijk is vanwege de transplantatie kamer op de rug.

Na 7-10 dagen wordt de transplantatie kamer verwijderd (afb. 2D). De huid zal zich herstellen. Een korst vormt zich op plaats van de wond (afb. 2E). Deze korst zal na één tot twee weken van de huid vallen en een humaan transplantaat is zichtbaar als een iets dikker gepigmenteerd »



Expert in the world
of research diets



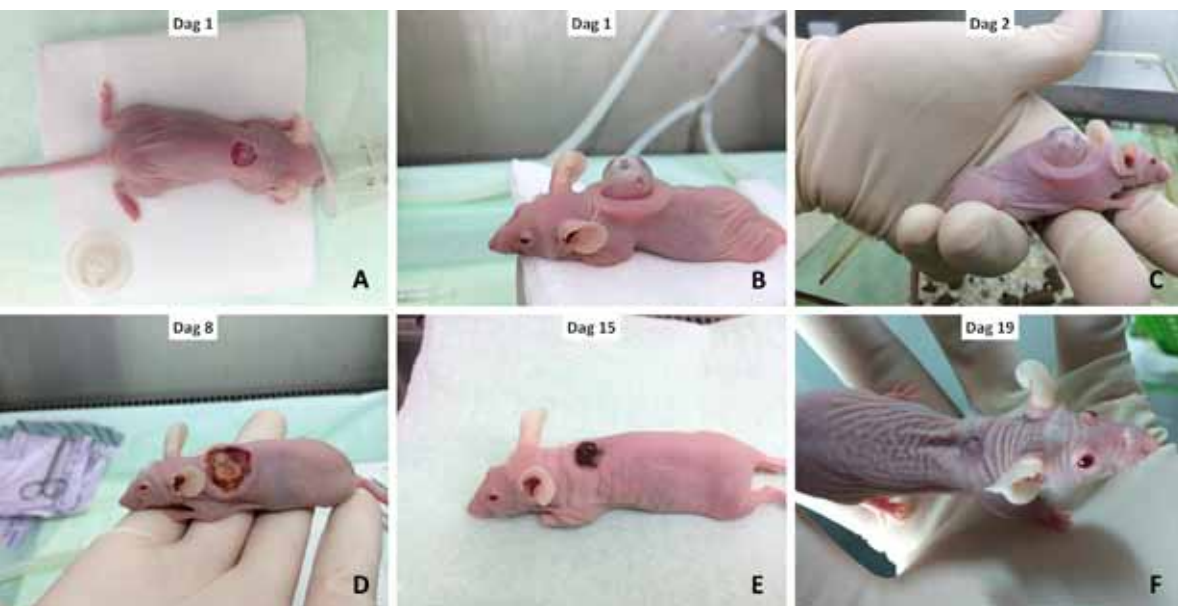
Tecnilab-BMI bv - Brouwer 6 - 5711 LD Someren

Tel: +31 (0)493 440706

Email: info@tecnilab-bmi.nl

www.sdsdiets.com

the essential resource for quality research diets



Afbeelding 2. Stapsgewijze procedure van het transplantatie experiment.

A. De kamer wordt getransplanteerd en de cellen worden geïnjecteerd.

C. De muis ontvangt de eerste 48 uur pijnbestrijding.

D. Op dag 8 wordt de kamer verwijderd en is het transplantaat te zien als een gelige plak in de wond van de kamer.

E. Op dag 15 begint de korst al een beetje los te laten.

F. Rond dag 19 valt de korst van de wond en is een genezen stukje huid te zien op de rug van de muis waarbij de humane huid te zien is als een iets dikker en gepigmenteerd stukje huid.

stukje huid (afb. 2F). Na vier weken wordt de huid geanalyseerd. Uit deze analyse blijkt dat de transplantaten goed differentiëren en een basaalmembraan wordt ontwikkeld.

Pilotstudie

De pilotstudie is het vervolg op de opzet van het muismodel. Hiervoor worden twaalf Athymische naakte muizen aangeschaft. Na een periode van groepshuisvesting, worden ze kort voor de operatie individueel gehuisvest. Zes muizen worden getransplanteerd met gezonde huidcellen en de andere zes muizen krijgen patiënt huidcellen. Met de therapie wordt twee tot zes weken na verwijdering van de transplantatiekamer, op het moment dat de korst van de wond valt, begonnen. Uit elke groep worden vier muizen gekozen die worden behandeld. De overige dieren worden gebruikt als onbehandelde controles. De muis wordt bij voorkeur niet gefixeerd omdat dit het transplantaat zou kunnen beschadigen. De subcutane injecties worden distaal van het transplantaat onder anesthesie gegeven. Euthanasie vindt acht weken na de start van de behandeling met de therapie plaats door verbloeding onder anesthesie. Het transplantaat wordt verwijderd voor analyse. Ook worden organen en bloed verzameld voor verdere analyse.

Huisvesting en verzorging

Opzet van het muismodel

Om het muismodel in Groningen op te zetten worden vier Athymische naakte muizen aangeschaft. Deze muizen worden individueel in IVC kooien gehuisvest, om te voorkomen dat zij na de operatie aan elkaars transplantatiekamer of aan het transplantaat gaan knagen. Daarnaast wordt alle kooiverrijking behalve nestmateriaal (in onze faciliteit worden kartonnen reepjes ge- »



Helping you

do research

better

Het leven van mens en dier verbeteren is waar uw onderzoek om draait

Om u te helpen bij het realiseren van die missie zijn we nu wereldwijd herkenbaar onder één naam, met één visie, met dezelfde waarden en een bedrijfsbrede passie voor hoogwaardig wetenschappelijk onderzoek.

Van beproefde Research Models & Services tot Contract Research van wereldklasse bieden we u de ervaring, kwaliteit en consistentie die van doorslaggevend belang zijn voor uw succes.

**Wij zijn Harlan Laboratories:
Helping you do research better**



Afbeelding 3. Voorbeeld van huisvesting in IVC kooien.

De Athymische naakte muizen worden gedurende dit onderzoek gehuisvest in IVC kooien met een speciaal op maat gemaakt RVS plaatje. In deze IVC kooi is tevens de kooiverrijking zichtbaar.

bruikt) verwijderd. Het voerrooster wordt uit de IVC kooi verwijderd en de muizen krijgen voer uit een schaalje verstrekt dat op de bodem van de kooi staat. Deze maatregelen dienen ervoor om beschadiging als gevolg van stoten, schuren of blijven haken met de transplantatiekamer of het implantaat te voorkomen. Op de plek van het voerrooster komt een op maat gemaakt plaatje RVS, zodat de muizen niet aan de rubberen ringen van de luchtventielen in de IVC kooi kunnen knagen, (afb. 3).

De pilotstudie

Voor de pilotstudie worden twaalf Athymische naakte muizen in de IVC unit gehuisvest. De dieren worden zo lang mogelijk in groepshuisvesting van twee groepen van zes dieren gehouden voor de sociale interactie. Tijdens de acclimatisatieperiode en na het dragen van de transplantatiekamer worden de muizen gehuisvest op corncob (Rehofix, Tecnilab). Deze wordt in de IVC unitstandaard gebruikt bij naakte muizen. Gedurende het dragen van de transplantatie kamer op de rug worden de muizen op cellulose bedding (Diamond Soft, Harlan) gehuisvest. Hiermee wordt voorkomen dat kleine deeltjes van de corncob bedding door de gaatjes van de transplantatie kamer kunnen dringen en schade aanrichten. Kort voor de transplantatie worden de muizen individueel gehuisvest. Net als bij de opzet van het muismodel worden ook hier de voerroosters vervangen door RVS plaatjes en wordt voer verstrekt via een schaalje op de bodem.

Tijdens de opzet van het muismodel blijkt, naarmate het onderzoek vordert, dat de muizen weinig nestgedrag vertonen. Omdat de muizen individueel gehuisvest zijn en naakt zijn is dit »



Disposable kooiverrijking



Kooiverrijking



Nestmaterialen



Europa's grootste assortiment
aan kooiverrijking en
nestmaterialen

Gecertificeerd, autoclaveerbaar en te bestralen.



Mini Thermacage

Gezamenlijke huisvesting.



wel iets wat ik graag zou willen zien en bevorderen. Ook het ontbreken van een plastic huisje of rolletje als kooiverrijking heeft mij gemotiveerd op zoek te gaan naar een uitdagend alternatief waarmee het nestgedrag wordt bevorderd. Ik heb gekozen voor geautoclaveerde papieren handdoekjes en verstrek deze zodra de pilotstudie begint. Deze eenvoudige kooiverrijking zorgt voor veel uitdaging; de muizen scheuren, slepen en bouwen er een nest van. Dit nestgedrag blijven ze gedurende het hele onderzoek laten zien. De individueel gehuisveste muizen van dit onderzoek worden om de week verschoond. De frequentie van schoonmaak ligt hoger dan bij andere individueel gehuisveste dieren, omdat de bedding sneller vervuild wordt door voer verstrekking via het schaalteje.

Welzijn en welzijnsbewaking

Alvorens een experiment start lees ik het IvD-protocol en de DEC-aanvraag. Hierbij ga ik vooral op zoek naar specifieke informatie die voor mij van toepassing is met betrekking tot de huisvesting, verzorging en welzijnsbewaking. Bij complexere experimenten vindt er een kort kennismaking gesprek plaats tussen mij en de onderzoeker, hetgeen ik als heel prettig ervaar omdat dit het contact tijdens het experiment alleen maar vergemakkelijkt. Tijdens het gesprek informeer ik altijd naar het te verwachten ongerief. Doordat ik enerzijds kennis heb van wat komen gaat op het gebied van het onderzoek en anderzijds op het gebied van ongerief kan ik goed inspelen op de belangen van de onderzoeker en van het proefdier. Deze kennis zorgt er tevens voor dat ik met vertrouwen de dieren verzorg en een goede controle kan uitvoeren. Ik kan gericht op signalen van dieren letten en hier adequaat op reageren.

Tijdens het beschreven onderzoek kan ik goed inspelen op de behoefte van de muizen voor andere kooiverrijking en heb dit in overleg met de onderzoeker aan kunnen passen. De muizen worden elke dag gecontroleerd door de diervoorzorg en de onderzoeker. Na het transplanteren wordt gelet op pijnsignalen aan de hand van de houding van de muis. De vacht is bij een muis een goede indicator om te zien hoe ze zich voelen, maar bij een naakte muis ontbreekt deze. Daarom vormt de houding, de manier van lopen, en de mate waarin ze zich bezighouden met de kooiverrijking en nestgedrag een belangrijke indicator. Het gewicht wordt regelmatig bepaald door de onderzoeker. Een extra punt om op te letten tijdens dit experiment is de huid; hoe gedraagt de muis zich ten opzichte van de transplantatie kamer op zijn rug? Hoe reageert de huid van de muis zich direct rondom de geplaatste transplantatie kamer? En hoe ontwikkelt zich de humane huid op de rug van de muis?

Conclusie

Ik vond het interessant en leerzaam om bij dit experiment betrokken te zijn. Bovendien was het waardevol om dieper in een onderzoek te duiken. Bij veel onderzoeken gebeurt er iets in het »

lichaam, wat voor mij ‘onzichtbaar’ blijft. Dit onderzoek was voor mij aantrekkelijk omdat duidelijk was waar te nemen wat op het lichaam gebeurde en hoe de muis hierop reageerde. Tevens heb ik geleerd dat het, om mijn werk goed te kunnen doen, waardevol is om (globaal) te weten wat er gebeurt. Dit geeft mij ook meer inzicht in onderzoeken en waarom en in welke fase van een onderzoek proefdieren worden ingezet. Deze manier van werken met proefdieren vind ik prettig en het geeft mij voldoening, maar dit moest ik wel eerst zelf ontdekken. Ik heb gemerkt dat veel onderzoekers het prettig vinden als er interesse wordt getoond. Een goede verzorging van hun proefdieren kan van cruciaal belang zijn voor hun onderzoek en staat hoog in het vaandel bij mij, de Centrale Dienst Proefdieren en de onderzoeker. Voor nieuwe en beginnende onderzoekers ben ik vaak een aanspreekpunt als het gaat om werken met dieren in IVC huisvesting en bij welzijnsproblemen. Een goede samenwerking tussen diervorzorger/biotechnicus en onderzoeker is dan ook van cruciaal belang. De leden van de IvD vraag ik om raad of hulp bij problemen waar ik zelf en/of de onderzoeker niet uitkomen. Daarnaast doen de dierenarts en een IvD-lid elke week een welzijnsronde langs de dierunits.

Ik wil de onderzoeker, Jeroen Bremer, bedanken voor zijn tijd en enthousiasme om mij te helpen met het verhaal door het verstrekken van informatie over EB en de foto's.

Met dank aan Jeroen Bremer, onderzoeker Rijksuniversiteit Groningen, Afdeling Dermatologie, UMC Groningen, j.bremer@umcg.nl

Bronnen

1. <http://www.umcg.nl/nl/zorg/volwassenen/zob2/epidermolysis-bullosa/pages/default.aspx>
2. <http://www.debra.nl>
3. <http://www.vlinderkind.nl/home/>
4. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA et al. (2014) *Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification*. Journal of the American Academy of Dermatology 70(6):1103-1126



«