

# SPF: goed bedoeld, maar het kan beter met 'wildlings'



Ron Boot<sup>1</sup> en Peter J. Heidt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>r.boot@hotmail.com; <sup>2</sup>Afdeling kindergeneeskunde, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

## Inleiding

Tot circa 1960 werden in biomedisch onderzoek vrijwel alleen conventionele dieren gebruikt. Een oplossing voor het probleem van infecties door virussen, bacteriën en parasieten werd gevonden door sanering via hysterectomie en de productie van SPF-dieren. Inherent aan de procedure is het verlies van alle niet-pathogene flora. Pogingen dit verlies te compenseren via toediening van flora zijn maar ten dele succesvol gebleken. Vrijwel alle huidige SPF-kolonies van muizen en ratten zijn gebaseerd op de zogenoemde Altered Schaedler Flora (ASF) [1,2]. Dieren uit kolonies met dit gestandaardiseerd microbioom van acht bacteriesoorten, vertonen echter eigenschappen van kiemvrije dieren die significant afwijken van de eigenschappen van conventionele dieren [3]. Dit roept de vraag op of ze wel een goed proefdiermodel zijn voor de mens die immers op de mucosa een complex microbioom bezit [4].

In het symposium bij de pensionering van Ron Boot werden argumenten aangedragen voor de stelling "de ontwikkeling en het gebruik van SPF-dieren is een dwaling" [5,6].

## Wildlings

Onze visie wordt opmerkelijk gesteund door recent onderzoek van Rosshart et al. [7] (Rosshart SP, Herz J, Vassallo BG et al. (2019) Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science* 365 [eaaw 4361]). De onderzoekers transplanteerden SPF C57Bl/6-embryo's in wilde *Mus musculus*. (Afb. 1). Met de nakomelingen werd een fok onder SPF-condities gestart en over meerdere generaties voortgezet. Deze zogenoemde 'wildlings' zijn genetisch C57Bl/6 en microbiologisch 'wild'.

Door vergelijking van het microbioom en de fenotypische, vooral immunologische, eigenschappen van de wildlings met die van SPF C57Bl/6- en wilde muizen kan het relatieve belang van microbiologie en genetica op de resultaten van experimenten worden geschat. Het microbioom op de mucosa van darm, huid, en vagina bij wildlings kwam sterk overeen met dat van de wilde muis. De samenstelling in soorten bacteriën en schimmels was veel

complexer dan die van het microbioom van SPF-muizen.

Het microbioom van de wildlings bleek stabiel over meerdere generaties, kon wel worden verstoord door toediening van antibiotica, maar het herstelde zich in enkele weken na stoppen van de behandeling.

## Immunologische eigenschappen

Het immuunfenotype van de drie groepen (wild, SPF en wildlings) werd onderzocht aan darm, huid en vagina als 'barrier sites' en de milt als centraal lymfoïde orgaan met behulp van cyto-metrie. Immunaactieve cellen in bloed werden onderzocht via RNA-sequencing.

Het immuunfenotype van milt en bloed was sterk onder invloed van het microbioom want SPF-muizen waren duidelijk afwijkend van beide andere groepen die sterk op elkaar leken. Op de mucosa was de invloed van het microbioom minder groot en bovendien meer variabel. Deze resultaten bevestigen de door Ericsson et al. [8] en Viney [9] gevonden verschillen in microbiota van wilde versus SPF-muizen en een sterkere humorale en cellulaire immunrespons maar mindere cytokinenrespons in wilde muizen vergeleken met die in SPF-muizen.

## Diermodellen

Ten slotte onderzochten Rosshart et al. [7] het gedrag van de drie groepen muizen (wild, SPF en wildlings) in modellen voor twee immuun-modulerende therapieën. Beide waren veelbelovend in eerder onderzoek met SPF-muizen, maar bleken helaas niet effectief en zelfs levensbedreigend in klinische studies in humane patiënten.

Het eerste onderzoek was gericht op adaptieve immunrespons. Hier viel de keuze op een CD28-superagonist die in SPF-muizen een sterke vermeerdering van T-reg cellen en IL-10-productie gaf die resulteerde in ontstekingsremming in modellen voor auto-immuniteit en transplantatie. Bij een fase 1-studie in humane patiënten ontstond echter een sterke activatie van T-cellen en een levensbedreigende cytokinestorm. Toediening van de CD28-superagonist in wildlings resulteerde in een immunreactie die overeenkwam met die welke gezien was in de patiënten in de fase 1-studie.

Het tweede onderzoek was gericht op aangeboren immuniteit. Hier viel de keuze op TNF-neutralisatie in een model voor septische shock. SPF-muizen met lipopolysaccharide (LPS) geïnduceerde endotoxemie vertoonden na toediening van een TNF- $\alpha$  neutraliserend antilichaam een sterke overleving. Helaas leverde deze benadering in de kliniek geen goed effect op en bleek zelfs geassocieerd te zijn met een verhoogde mortaliteit. De evaluatie van dezelfde studie in wildlings gaf, in tegenstelling tot de resultaten verkregen in SPF-muizen, geen positief resultaat na toediening van LPS om een lethale endotoxemie te induceren.

In beide modellen bleken wildlings een veel betere voorspeller dan SPF-dieren.

Als in het dierexperimenteel onderzoek wildlings waren gebruikt, waren de klinische studies zeer waarschijnlijk niet gedaan.

## Bredere toepassing van wildlings?

Een normaal gastheerspecifiek microbioom is essentieel voor een goede ontwikkeling van het aanboren en het adaptieve immuunsysteem; het immuunsysteem op haar beurt bepaalt mede de samenstelling van het microbioom.

De waarnemingen van Rosshart et al. [7] zijn potentieel relevant voor alle velden in medisch-biologisch onderzoek waarin het immuunsysteem een rol speelt [10, 11], dus in vrijwel alle onderzoeksvelden. Het zijn ook de velden met veelal een historie van gunstige resultaten van dierexperimenten die bij vertaling naar de kliniek vaak sterk tegen vallen [12].

Nadeel van toepassing van wildlings is natuurlijk de potentiële aanwezigheid van een breed

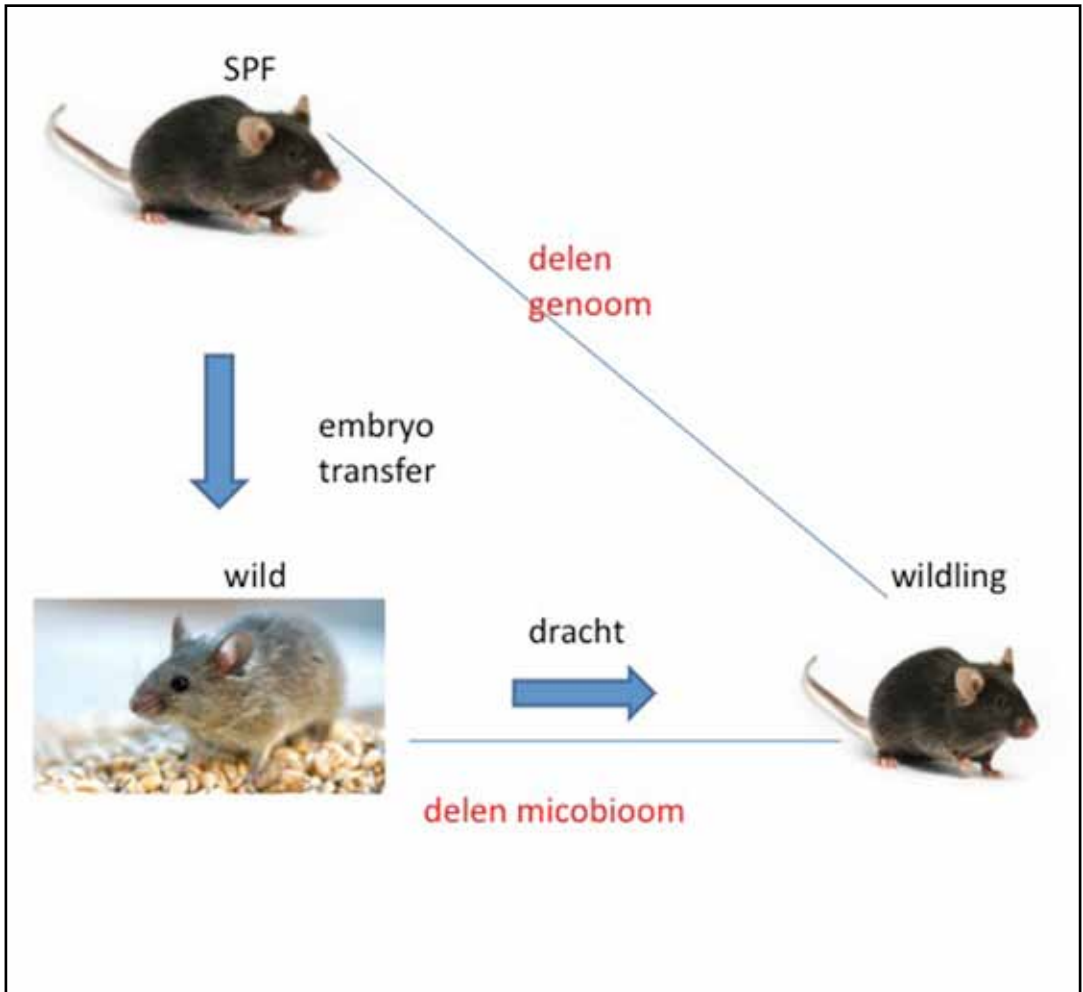
»

scala aan proefdierpathogene micro-organismen, waaronder de verwekkers van zoönosen. Werk met wildlings is echter denkbaar zonder de klassieke uitbraken van infecties die aanleiding zijn geweest voor het concept van SPF-dieren. Door toepassing van IVC's wordt de microbiologische unit op het niveau van de kooi gebracht [13] en hanteren van dieren kan plaatsvinden in en klasse II biosafety kabinet. Hierdoor kan ook het risico van virale zoönosen bij verwerking van dierlijk onderzoeksmateriaal in het laboratorium worden beperkt. Idealiter kunnen deze risico's worden verkleind door selectie van wildlings voor de fok.

Wij pleiten sterk voor nader onderzoek naar de mogelijkheden om met het gebruik van wildlings de translatie van de resultaten van diermodellen voor de mens te verbeteren. Indien wildlings betere voorspellers blijken te zijn dan huidige SPF-dieren, dan zou onderzoek in wildlings een essentieel onderdeel moeten zijn van het proefdieronderzoek dat voorafgaat aan klinische trials in de mens.

**De literatuurlijst kan opgevraagd worden bij de eerste auteur.**

Afbeelding 1. Wilde muizen geïmplant met embryo's van SPF C57/Bl/6-muizen, leveren de nakomelingen: wildlings. Deze zijn genetisch C57Bl/6 en microbiologisch 'wild'. Door vergelijking van het microbioom en de fenotypische eigenschappen van wildlings met die van SPF C57Bl/6- en wilde muizen kan het relatieve belang van microbioom en genoom op de resultaten van experimenten worden geschat.



«