

EEN ZEER SPECIALISTISCHE TECHNIEK:

# harttransplantaties bij de muis

Ilona van den Brink, Debby Smits, Brenda van Vliet

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

## Inleiding

In 1996 is de afdeling Nierziekten in samenwerking met de afdeling Pathologie van het UMC St Radboud begonnen met het opzetten van het harttransplantatie model. De afdeling Nierziekten doet veel immunologisch onderzoek en maakt daarbij gebruik van een diermodel voor transplantataafstoting. In het verleden werden hiervoor veel huidtransplantaties uitgevoerd bij de muis. Huidtransplantaties hebben echter als nadeel dat er geen directe doorbloeding van het transplantaat plaatsvindt. Er moet altijd gewacht worden op vaatingroei die optreedt na de totstandkoming van connecties tussen donor- en ontvangerbloedvaten. Ook bestaat in het huidtransplantatie model de mogelijkheid dat het endotheel van de vaten van het transplantaat uiteindelijk niet van donor maar van ontvangerorigine is. Deze nadelen zorgden er voor dat er behoefte ontstond aan een model met een gevasculariseerd transplantaat. Omdat veel kennis bestond over transplantatie-immunologie bij de muis, en veel beschikbare onderzoeksmaterialen, zoals antistoffen, specifiek waren voor muizen was er een voorkeur voor een model in muizen. Harttransplantaties bij muizen was toen al een bestaande en gepubliceerde techniek (1, 2, 3).

Men besloot de techniek naar Nijmegen te halen en ging naar Oxford om daar de techniek te leren. Het is een techniek die met een behoorlijke precisie uitgevoerd moet worden. Inmiddels zijn er twee biotechnici die de techniek kunnen uitvoeren. Momenteel zijn er meer dan 700 transplantaties uitgevoerd en wordt een slagingspercentage van 89% behaald.

## Harttransplantatiemodel in Nijmegen

Op het moment zijn er twee onderzoeksgroepen die het harttransplantatiemodel voor hun studies gebruiken. De afdeling Nierziekten en de afdeling Bloedtransfusie en Transplantatie Immunologie (ABTI). De afdeling Nierziekten gebruikt dit model voor onderzoek, met als doel een cellulaire therapie te ontwikkelen voor humane ontvangers van een nier. Nu slikken patiënten die een niertransplantatie moeten ondergaan nog veel immuunsuppressieve geneesmiddelen, met als bijwerking verhoogde kans op infecties en kanker. Bekeken wordt of door toediening van een speciaal type donorcellen (dendritische cellen) tolerantie kan ontstaan voor het getransplanteerde orgaan. Daarmee zouden immuunsuppressieve geneesmiddelen (deels) overbodig worden.

Ook de afdeling ABTI onderzoekt een cellulaire therapie om transplantataafstoting te voorkomen.

Zij richten zich in het bijzonder op een ander type cel, de regulatoire T-cellen. Bij de muizen worden de bewerkte cellen (T-cellen/dendritische cellen) voor, tijdens of na de operatie toegediend om vervolgens het afstotingsproces te volgen door middel van palpatie. Het voordeel van een transplantaat met vaatanastomosen is dat het zo goed mogelijk overeenkomt met orgaantransplantatie bij de mens, waardoor de resultaten van experimenten waardevoller worden.

## Hoe wordt een harttransplantatie uitgevoerd?

Bij een harttransplantatie wordt een hartje van de donormuis uit geprepareerd en in de buikholt van de ontvangermuis geplaatst. Omdat het hartje dus niet in originele positie wordt geplaatst, noemt men dit een heterotope transplantatie. De aorta en de *arteria pulmonalis* van het hartje worden aan de abdominale aorta en de *vena cava inferior* van de ontvanger

gehecht via een end-to-side hechtmethode. De bloedsomloop in het hartje zal hierdoor anders dan normaal verlopen. Het bloed stroomt vanaf de ontvanger-aorta de donoraorta in. Bij de gesloten aortaklep gaat het bloed de coronair vaten in. Als het myocard is voorzien van bloed worden de eiwitten actief die zorgen voor het contraheren van de hartspeer waar door het hart gaat 'kloppen'. Nadat de coronairvaten zijn gepasseerd komt het bloed via de coronaire sinus in het rechter atrium en wordt het door de rechter ventrikel de *vena cava inferior* ingepompt. Het hartje heeft in de buik geen directe functie. Het is een gevasculariseerd transplantaat waarvan men het functioneren (kloppen) aan de buitenkant kan waarnemen door het abdomen te palperen. Het afstotingsproces is zo heel makkelijk te volgen.

## Materiaal en methode

### Dier en huisvesting

De muizenstammen die voor harttransplantatie experimenten gebruikt worden zijn BALB/c, C3H/Hey, CB6F1 en de C57Bl/6N. Er worden mannen gebruikt met een leeftijd van acht tot tien weken. Zij hebben een SPF-status en worden op een SPF-afdeling gehuisvest.

De procedure wordt uitgevoerd met behulp van een operatiemicroscop, Leica ms-1. Het vergrotingsbereik van deze microscoop is max 13,5 keer.

## Transplantatieprocedure

### Prepareren ontvanger

Voor de anesthesie word gebruik gemaakt van een 1:50-verdunning van Hypnorm® en water (Fentanyl 0,315 mg/ml en fluanisone 10 mg/ml) en uit een 1:10-verdunning van water en midazolam (5mg/ml). Van beide verdunningen krijgen de muizen 20 ml/kg s.c. toegediend.

De buikholte wordt geopend door een abdominale incisie van de zaadblazen tot het xifoid. Door middel van een wondspreider wordt de buikholte opengehouden. Het darmpakket wordt in een vochtig gaasje gewikkeld en zoveel mogelijk opzij geschoven. De *vena cava inferior* en de abdominale aorta worden vrij geprepareerd van de omliggende weefsels. Als de aorta en *vena cava* opgetild worden, zijn er vaak enkele lumbale vaatjes zichtbaar die afgebonden dienen te worden. Vervolgens wordt ruimte gemaakt richting

de bifurcatie van aorta en *vena cava* enerzijds en de aftakking van de arteria en *vena renalis* anderzijds om in het verdere verloop van de procedure de vaatklemmetjes te kunnen plaatsen. De ontvangermuis kan vervolgens worden weggelegd met een vochtig gaasje over de geopende buikholte.

### Prepareren donor

Voor de anesthesie van de donormuis wordt eveneens gebruik gemaakt van Hypnorm® en midazolam. De anesthetica worden opgelost in water in de verhouding een deel Hypnorm®, een deel midazolam en twee delen water. De muizen krijgen hiervan 1ml/kg i.p. toegediend.

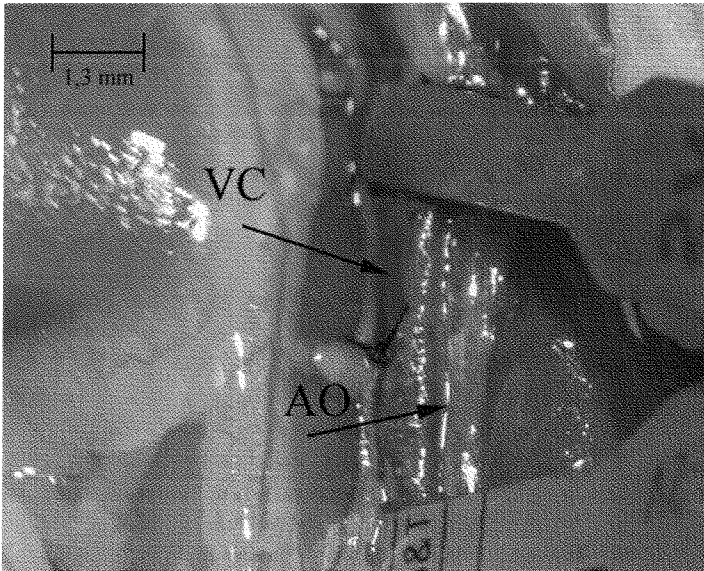
De abdominale holte van de donor wordt geopend en met een heparine-oplossing (400IE/ml) via de *vena cava inferior* wordt de muis gehepariniseerd (27G-naald). De muis wordt verbloed door de *vena cava inferior* en de aorta door te knippen. Het hartje wordt blootgelegd door de thorax open te knippen en open te klappen. Het hartje wordt koel gehouden door een gaasje doordrenkt met op ijs gekoeld fysiologisch zout op het hartje te leggen.

De *vena cava inferior*, de *vena azygos* en de *vena cava superior* worden afgebonden (7-0 zijde) en doorgenomen. De *aorta ascendens* wordt afgeknipt proximaal van de aftakking *arteria branchiocephalica*. De *arteria pulmonalis* wordt net proximaal van de bifurcatie doorgenomen. Met een op ijs gekoelde fysiologische zoutoplossing word het hartje geflushed. Tussendoor wordt op het hartje geduwd, zodat bloed en lucht eruit kan. Uiteindelijk wordt een ligatuur aangebracht om de longvenen. Via deze ligatuur wordt het hartje uit de thorax verwijderd.

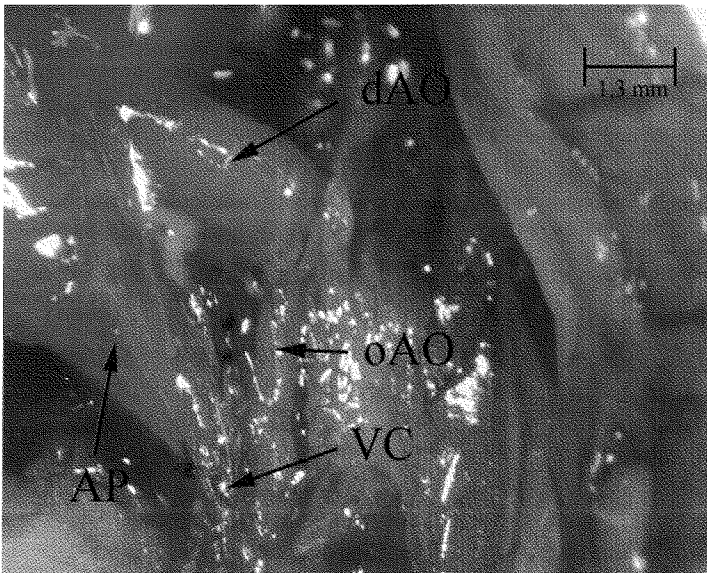
Het hartje wordt vervolgens in een bakje geplaatst met fysiologische zoutoplossing op ijs.

### Transplanteren van het donorhartje

Als eerste worden er vaatklemmetjes geplaatst op de aorta en de *vena cava inferior* (samen in één klemmetje); de proximale klem net onder de aftakking van de niervaten, de distale klem net boven de bifurcatie (Afb. 1). Dan wordt met een 27G-naald een gaatje gemaakt aan de ventrale zijde van de aorta. Het hartje wordt rechts van de aorta van de ontvanger geplaatst, met de donoraorta naar boven wijzend. Met een microchirurgisch schaarje wordt het gaatje vergroot tot een incisie. Beide vaatanastomosen worden op dezelfde manier aangebracht met nylon 10-0. Eerst word er



Afbeelding 1. Afgekleemde aorta (AO) en vena cava (VC).



Afbeelding 2. End-to-side anastomosen voltooid, donor aorta (dAO) aan ontvanger aorta (oAO) en arteria pulmonalis (AP) aan vena cava (VC).

begonnen met het maken van twee hoekhechtingen aan de ontvangervaten. Het uiteinde van het donornvat en de zijkant van het ontvangervat kunnen vanuit een van de twee hoekhechtingen doorlopend gehecht worden (end-to-side anastomose). Beide zijdes kunnen met vier steken voldaan worden. Er wordt begonnen met de aorta en geëindigd met de *arteria pulmonalis*. Als de vaathechtingen voltooid zijn kunnen de

klemmen er af (Afb. 2). Eerst wordt de onderste klem verwijderd omdat de druk daar het minst hoog is. Als de klemmen er af zijn en de vaten vullen zich goed, dan zal het hartje binnen enkele ogenblikken gaan kloppen. Mocht dit niet zo zijn dan kan het hartje gemasseerd worden om de bloedsomloop op gang te krijgen. Uiteindelijk wordt het darmpakket weer terug gebracht in de buikholte. Het peritoneum wordt doorlopend en de huid wordt met afzonderlijke hechtingen gehecht. (Vicryl 5-0). Post-operatief krijgen de muizen pijnstilling door middel van een i.m.-injectie buprenorphine (3 ug/kg) eenmalig, en gaan ze onder een warmtelamp (maximaal 30 °C). Driemaal in de week worden de getransplanteerde muizen gepalpeerd en de kracht waarmee het hartje klopt, wordt gescoord om zo het afstotingsproces te volgen.

## Resultaten

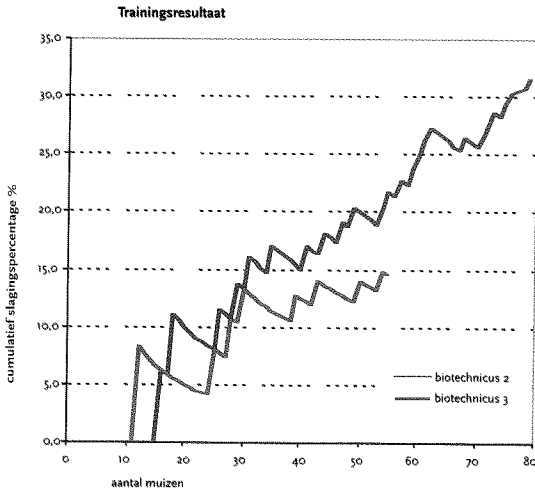
### Training

Deze techniek wordt uitgevoerd door medewerkers van het Centraal Dierenlaboratorium. Het kost vrij veel tijd en moeite om de techniek onder de knie te krijgen. Er wordt een hoge precisie geëist en een fijne motoriek van de biotechnicus om de operatie tot een goed eind te brengen. Verschillende mensen die hebben geprobeerd zich de techniek eigen te maken zijn halverwege gestrand. Op dit moment zijn er twee biotechnici die de operaties uitvoeren

in experimenten (biotechnici 1 en 2). Daarnaast is er nog een derde biotechnicus in training om zich de techniek eigen te maken (biotechnicus 3).

In grafiek 1 is de leercurve weergegeven van biotechnicus 2 en 3. Op de x-as staat het aantal muizen weergegeven dat gebruikt is voor de training en op de y-as het cumulatieve slagingspercentage. Biotechnicus 2 heeft na 79 transplantaties een slagingsper-

Grafiek 1. De leercurve weergegeven van biotechnicus 2 en 3.



centage van 31,6% en is daarom gaan transplanteren in experimenten. Biotechnicus 3 is nog in training en zit na 55 transplantaties op een slagingspercentage van 14,5%. In de grafiek is duidelijk een stijgende lijn zichtbaar en neemt het aantal geslaagde operaties toe naarmate de techniek vaker geoefend is. De tijd die nodig is om tot 30-50% slagingspercentage te komen is afhankelijk van de frequentie waarmee getraind kan worden, maar zal bij een à twee operaties per week meer dan een jaar gaan bedragen.

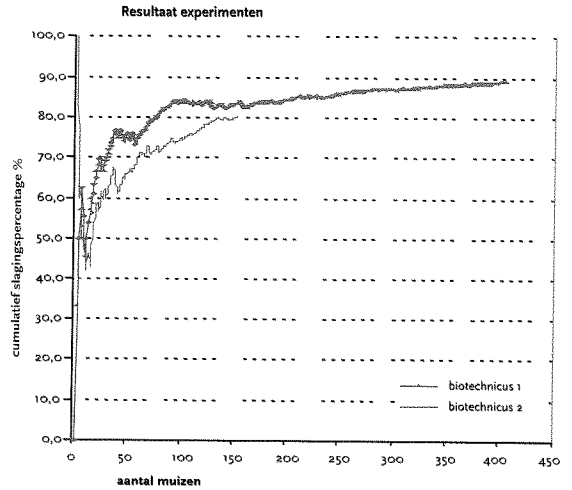
### Experimenten

De trainingsgegevens van biotechnicus 1 waren niet meer beschikbaar en zijn dus niet meegenomen in de grafiek. Biotechnicus 1 is ook anders gestart dan biotechnicus 2 en 3. Biotechnicus 1 was namelijk de enige die de transplantaties op dat moment kon uitvoeren en begon daarom vrij snel aan transplantaties in het kader van experimenten. Dit is zichtbaar in grafiek 2, waarin het slagingspercentage van de operaties van dieren in experiment zijn weergegeven. Biotechnicus 2 begon met transplantaties voor experimenten na een langer durend trainingsproces en stapte daar dus anders in (31,6% slagingspercentage)

Op dit moment heeft biotechnicus 1 in totaal 488 muizen geopereerd en haalt een cumulatief slagingspercentage van 89%.

Biotechnicus 2 heeft in totaal (inclusief de trainingsprocedures) 255 transplantaties verricht met een slagingspercentage van 80%. Zoals zichtbaar in grafiek 2 blijft de lijn stijgen. Dit houdt in dat er na

Grafiek 2. Slagingspercentage van biotechnicus 1 en 2.



255 operaties nog steeds verbeteringen mogelijk zijn, o.a. door verbeterde feeling, snelheid en overzicht.

### Complicaties

Tijdens de operatie en ook in de daaropvolgende dagen kunnen er vrij veel verschillende problemen ontstaan. De eerste problemen die ontstaan tijdens het opereren komen vaak door de onervarenheid van de biotechnicus. Hierdoor wordt de operatie vaak ernstig vertraagd, bloedt de muis dood of scheuren de vaten waardoor het onmogelijk wordt de anastomosen af te maken. Als het technische gedeelte van de transplantatie probleemloos verlopen is, dan zijn er nog andere mogelijkheden waardoor de transplantatie zou kunnen mislukken.

- Ischemie van de achterpoten, dit is bij donkere muizen lastig te zien en word dan pas vaak de volgende dag ontdekt als de muizen wakker zijn. Soms doet het hartje het wel en soms niet.
- Het niet kunnen plassen/leggen van de blaas. De muizen doen het bij dit verschijnsel de eerste twee dagen vrij goed, maar worden daarna steeds zieker, bij palpatie is een overvolle blaas te voelen. Deze complicaties zijn niet direct te verklaren. Technisch zijn deze transplantaties vaak goed uitgevoerd maar waarschijnlijk is er toch ergens niet zichtbaar iets beschadigd. Mogelijk is, bij de muizen die na drie dagen ziek worden omdat ze niet kunnen plassen, de sacrale zenuw beschadigd, die zorgt voor het ledigen van de blaas. Maar dit is nooit bewezen.

Ook bij de muizen die ischemie van de achterpoten

vertonen is nooit een echte oorzaak gevonden. Bekend is dat de fysiologische parameters zoals ademhaling en zuurstofgehalte van de muis door een ingrijpende operatie als deze erg zakken. Daarom hebben we besloten de muis zuurstof via een kapje toe te dienen tijdens de operatie. Hier door is de frequentie van ischaemische verschijnselen gedaald, maar ze komen nog steeds voor.

Bij het analyseren van de gegevens is ook gekeken naar de tijdsduur van de operaties. Verwacht werd dat een te lange operatietijd het slagingspercentage zou verkleinen, maar een direct verband tussen de operatietijd en het mislukken van de transplantatie is niet gevonden. Alle operaties die binnen twee uur plaats vonden hebben een kans van slagen. Onze ervaring is dat operaties die juist (te) snel gedaan worden mislukken doordat door de snelheid de kans op fouten toeneemt.

#### Tot slot

**Deze techniek is getraind door diverse biotechnici. Deze biotechnici zijn zelf verantwoordelijk voor het uitvoeren van de operatie en het ongerief dat de muizen ondergaan. De humane endpoints die gehanteerd worden tijdens de trainingen staan beschreven in een DEC-aanvraag die speciaal opgezet is om technieken te trainen (o.a. indien een muis niet meer in staat is zijn lichaamstemperatuur op peil te houden, beperkte mobiliteit met als gevolg verminderde**

**voer- en wateropname (en daardoor uitdroging). Momenteel wordt nog gekeken naar mogelijkheden om de pijnbestrijding te optimaliseren.**

Als conclusie kunnen we stellen dat harttransplantaties bij muizen een zeer lastige techniek is, die heel veel oefening vergt.

Ook is er veel doorzettingsvermogen en concentratie van de biotechnicus voor nodig. Met voldoende ervaring kan een hoog slagingspercentage worden behaald. Enkele complicaties zijn nog niet opgehelderd. Maar als de operatie succesvol uitgevoerd is, geeft dat veel voldoening en kunnen er met de muizen waardevolle experimenten gedaan worden.

#### Literatuur

- 1 Corry RJ, Winn HJ, Russell PS (1973). *Heart transplantation in congenic strains of mice*. *Transplant. Proc.* 5(1): 733-5
- 2 Blanchard JM, Pollak R (1985). *Techniques for perfusion and storage of heterotopic heart transplants in mice*. *Microsurgery* 6:169-174
- 3 Niimi M (2001). *The technique for heterotopic cardiac transplantation in mice: Experience of 3000 operations by one surgeon*. *J Heart Lung Transplant.* 20(10):1123-8
- 4 Van Pel M, Hilbrands L, Smits D (2003). *Permanent acceptance of both cardiac and skin allografts using a mild conditioning regimen for the induction of stable mixed chimerism in mice*. *Transplantatie immunologie* 11(1): 57-36
- 5 Emmer PM, van der Vlag J, Adema GJ, (2006). *Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness*. *Transplantation* 27;81 (10) : 1451-9.
- 6 Coenen JJ, koenen HJ, van rijssen E (2005). *Tolerizing effects of co-stimulation blockade rest on functional dominance of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Transplantation* 27;79 (2) :147-5

# oproep

**De Commissie Prijs Alternatieven voor Dierproeven roept op tot het indienen van voorstellen voor**

**de Prijs Alternatieven voor Dierproeven 2007**