

Proefdieren voor vergelijkend atherosclerose-onderzoek

Dr. C. F. HOLLANDER

WERKGROEP EXPERIMENTELE GERONTOLOGIE TNO

Samenvatting

Een kort overzicht wordt gegeven over het spontaan voorkomen van atherosclerose bij dieren, waarbij de nadruk ligt op vergelijkbaarheid van de waargenomen afwijkingen met de menselijke atherosclerose. Aap, varken (ook het minivarken) en walvis (killer whale) lijken het meest geschikt voor vergelijkend atherosclerose-onderzoek.

Summary

A short review is given of the occurrence of spontaneous atherosclerosis in animals with special regard to the resemblance to human atherosclerosis. Primates, swine (including minipig) and killer whale seem to be the most suitable animals for comparative atherosclerosis research.

Bij bestudering van ouderdomsprocessen is de laatste jaren gebleken dat het van groot belang is om te weten of een waargenomen afwijking een gevolg is van veroudering van het onderzochte orgaan of orgaansysteem, of dat men te maken heeft met een proces dat reeds op jeugdige leeftijd ontstaat. Is het laatste het geval, dan wordt ten onrechte een afwijking als „typische ouderdomsverandering” gekenmerkt. Dit geldt ook voor de afwijkingen die gevonden worden aan het hart en vaatstelsel — waarvan atherosclerose een van de belangrijkste is — zoals in het onderstaande voorbeeld geïllustreerd zal worden.

Bij een studie naar het voorkomen van veranderingen in het hart en vaatstelsel van de oude rat werd regelmatig, zowel bij mannelijke als vrouwelijke dieren, een stukje kraakbeen aan de basis van de aortakleppen gevonden (fig. 1). Hueper (1939) beschreef voor het eerst kraakbeenhaardjes in de wand van de aorta van jong volwassen muizen en ratten. Wexler (1964) verrichtte een uitvoerig onderzoek bij de rat naar het optreden van vaatveranderingen met het stijgen van de leeftijd. Naast arteriosclerotische veranderingen vond ook hij kraakbeen in het hart van de rat. Hij localiseerde dit echter in de annulus fibrosus en zegt dat het bekend is, dat de hoeveelheid kraakbeen toeneemt met het stijgen van de leeftijd. Bojanus (1819, 1819-1821) beschreef botvorming in kraakbeen dat op dezelfde plaats als bij de rat gevonden werd in het hart van oude schildpadden. Greil (1903) verbond hieraan de naam „ossiculum cordis Bojani”. Bij oude ratten werden in het kraakbeenstukje geen tekenen van verbening gevonden. Het leek wenselijk om na te gaan of bij de rat dit kraakbeenstukje inderdaad een uiting was van veroudering van de aorta, of dat, zoals door de studie van Hueper gesuggereerd werd, het eerder als een normale structuur opgevat moest worden. Daartoe werden op verschillende leeftijden, te beginnen bij de dag

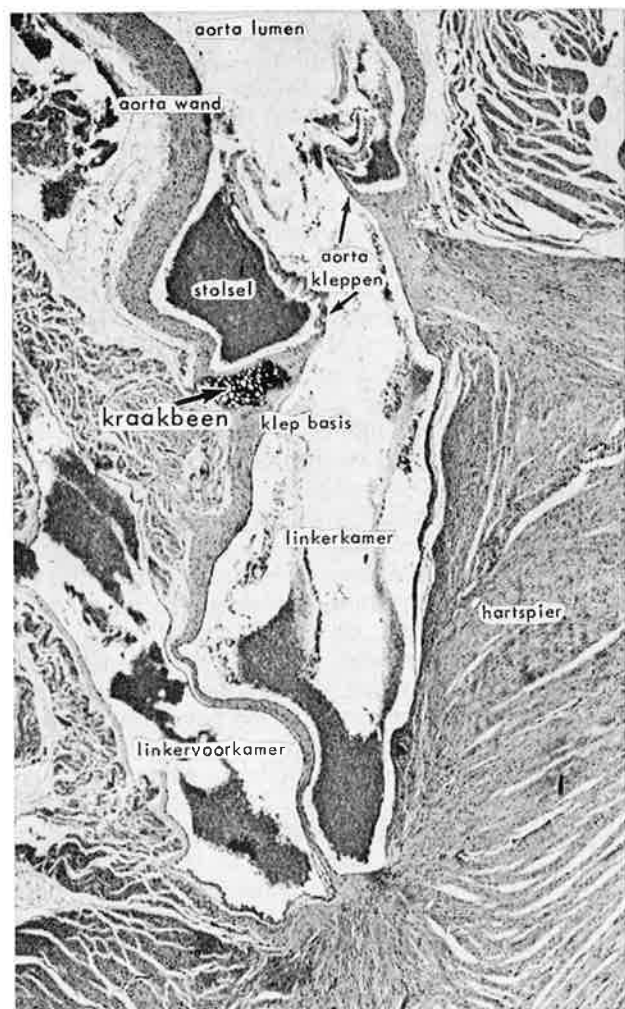


Fig. 1. Aortaklep van een 2½ jaar oude, vrouwelijke rat met stukje kraakbeen in de aortawand aan de basis van de klep. (longitudinale coupe; HE., 40x.).

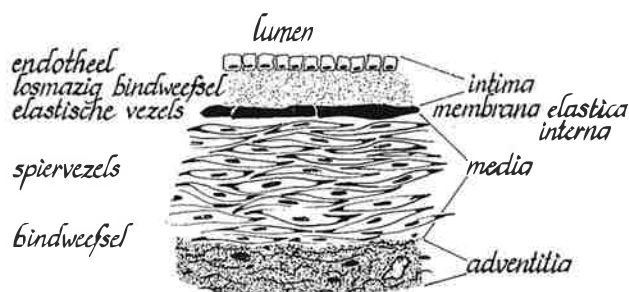


Fig. 2. Schema van de bouw van een arterie.

van geboorte, de harten van ratten onderzocht. Uit dit onderzoek bleek dat vanaf de zevende levensdag kraakbeen in de aortawand ter plaatse van de kleppen gevonden werd. Dit werd bij 100% van de onderzochte mannelijke en vrouwelijke dieren waargenomen (Hollander, 1968).

Het bovenstaande toont aan, dat, wil men een bepaalde afwijking die op oude leeftijd voorkomt juist interpreteren, een vergelijkende studie op verschillende leeftijden daaraan vooraf dient te gaan. Dit geldt nog stringenter voor het experimenteel atherosclerose-onderzoek. Immers, veel van dit onderzoek wordt verricht bij relatief jonge proefdieren, die dikwijls een onfysiologisch dieet krijgen en waarvan niet altijd bekend is welke vaatveranderingen spontaan bij deze dieren voorkomen, zowel in de vrije natuur als onder de omstandigheden waaronder deze dieren in het laboratorium gehouden worden. Jonge dieren worden voor dit onderzoek gebruikt omdat oude dieren moeilijk verkrijgbaar en kostbaar zijn. Bovendien gaat het hier om betrekkelijk kort durende proeven en is door het gebruik van jonge proefdieren herhaling of modificatie van de proefopstelling gemakkelijk. Immers, men kan doorgaans veel sneller beschikken over een voldoende groot aantal jonge proefdieren dan over oude proefdieren. Levij en Ungar (1967) toonden aan hoe belangrijk vergelijkend onderzoek bij de mens kan zijn. Zij vonden in een groep Yemenitische Joden van vergelijkbare leeftijd (50 jaar en ouder) bij diegenen die reeds geruime tijd in Israël woonden aanzienlijk meer en ernstiger atherosclerotische afwijkingen van aorta en coronairarteriën dan bij recent geïmmigreerden. In de jongere leeftijdsklasse (20 tot 49 jaar) kwam atherosclerose van de aorta frequenter voor bij diegenen die al lang in Israël woonden. De frequentie waarin afwijkingen van de coronairarteriën gevonden werden was voor beide groepen gelijk.

In figuur 2 wordt schematisch de bouw van een arterie weergegeven. Aan de lumenzijde wordt deze bekleed door één cellaag, het endotheel. Hieronder ligt een dun laagje losmazig bindweefsel. Endotheel en bindweefsel vormen tezamen de intima. De media, of spierlaag, wordt van de intima gescheiden door een membraan opgebouwd uit elastische vezels, de membrana elastica interna. Aan de buitenzijde wordt het vat ten slotte bedekt door een bindweefsel laag, waarin o.a. kleine vaatjes lopen, de adventitia.

Atherosclerose wordt gedefinieerd (Wereldgezondheidsorganisatie, 1958) als een variabele combina-

tie van veranderingen in de intima van arteriën, bestaande uit haardsgewijze ophoping van lipoiden, polysacchariden, bloed, bloedprodukten, bindweefsel en calciumneerslagen, gepaard gaande met veranderingen in de media.

Arteriosclerose is een veelomvattende term waaronder verstaan wordt alle vaatveranderingen die gepaard gaan met verharding, met een stugger worden van de vaatwand. Atherosclerose is één vorm van arteriosclerose; de sclerose van Mönckeberg, waarbij kalk afgezet wordt in de media van arteriën, en de arteriolosclerose, die zoals de naam aangeeft beperkt is tot veranderingen in de kleinere arterietakjes (arteriolen), zijn andere vormen hiervan.

Binnen de opzet van de Werkgroep Experimentele Gerontologie TNO leek het wenselijk om na te gaan bij welke aanwezige proefdiersoorten spontaan atherosclerose voorkomt. De reden hiervoor was drievoudig. Komen bij proefdieren (muis, rat, aap), die veelvuldig door de Werkgroep en het Radiobiologisch Instituut TNO in langlopende experimenten gebruikt worden, spontaan atherosclerotische vaatveranderingen voor? Welke invloed heeft het experiment, bijvoorbeeld bestraling of dieet, op deze afwijkingen? Bestaan er diersoorten, niet bij bovengenoemde Werkgroep en Instituut aanwezig, die zich beter lenen voor onderzoek naar de pathogenese van atherosclerose? Als voorwaarden voor deze vergelijkende studie werd gesteld dat de afwijking morfologisch identiek diende te zijn aan de voorkomende afwijking bij de mens.

De onderstaande gegevens zijn grotendeels afkomstig uit de verhandelingen van een conferentie over vergelijkende atherosclerose, die gehouden werd in januari 1964 (Comparative atherosclerosis. 1965).

Muis, rat.

Bij geen van beide diersoorten werden spontaan atherosclerotische vaatveranderingen gevonden. Wexler et al. (1968) beschreef bij ratten, die intensief voor de fok gebruikt waren, arteriosclerotische veranderingen, die begonnen in de aorta, gepaard gingen met kalkafzetting en waarbij ten slotte ook de coronairarteriën aangetast werden. De coronairarterie-afwijkingen bestonden uit zwelling van de gladde spiervezels, schuimcellen en vernauwing van het lumen. De schuimcellen bevatten geen lipoid, doch mucopolysacchariden. In eigen onderzoekingen werden in de aorta van oude ratten geen afwijkingen gezien. In de hoofdtakken van de arteria pulmonalis werden regelmatig kalkafzettingen in de wand gevonden, die voornamelijk in de media lagen en deden denken aan beelden die gevonden worden bij de sclerose van Mönckeberg. Een enkele keer werden coronairarterietakken gevonden waarvan de wand gezwollen en gehomogeniseerd was en het lumen vernauwd. Schuimcellen werden in deze gezwollen vaatwanden niet waargenomen. Met histologische kleurmethoden bleek de homogene wandsubstantie positief te kleuren voor fibrine. Een enkele maal werd in een coronair- of nierarterietakje subintimaal fibrineafzetting gezien met schuimcellen (fig. 3a, b).

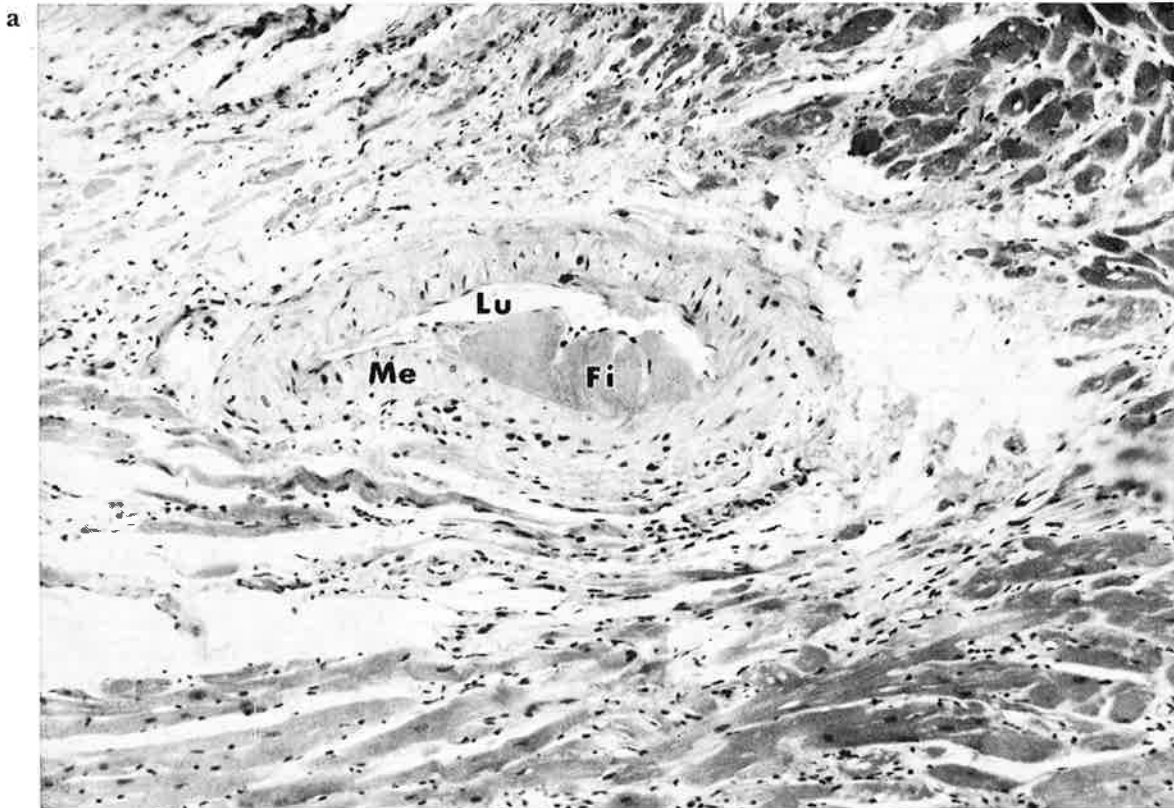
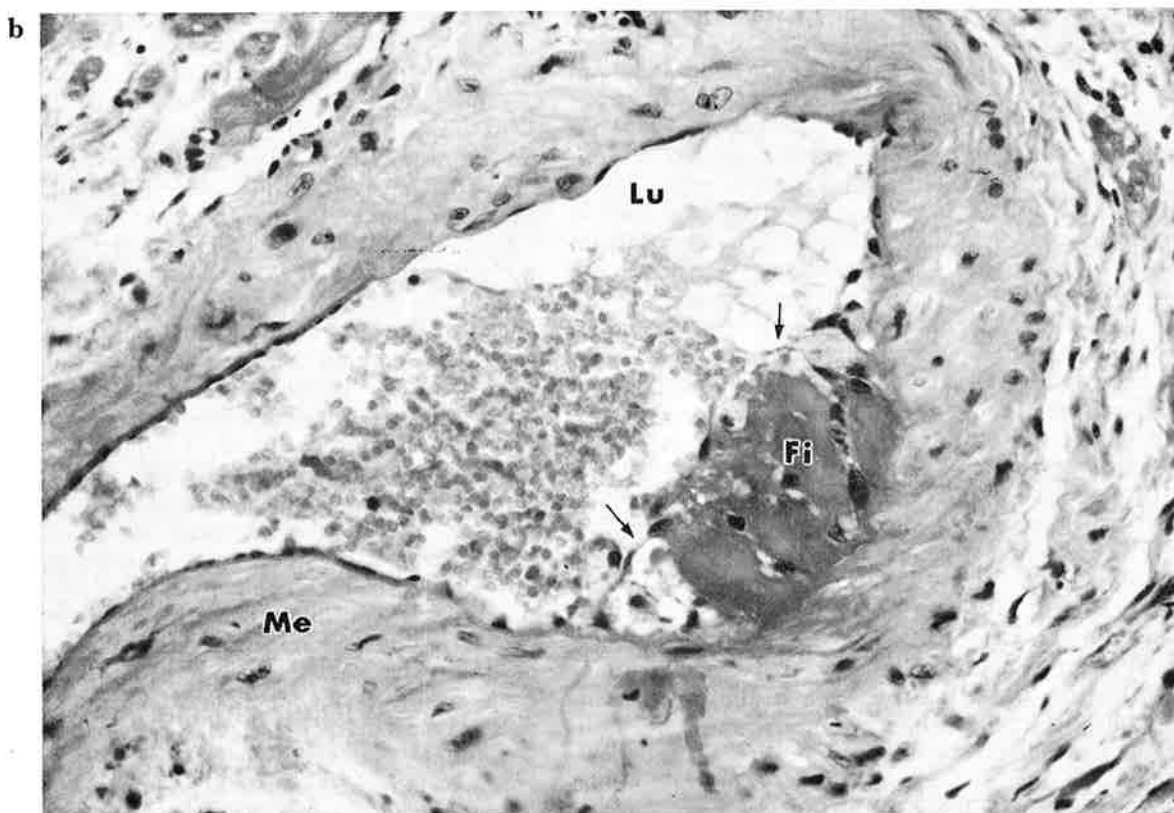


Fig. 3. Subintimale fibrine-afzetting (fi) met schuimcellen (pijl) in een coronairarterie-takje van een 2½ jaar oude, mannelijke rat. (lu:lumen; me:media) a. overzicht van een coronairarterie met vernauwing van het lumen door subintimale fibrine-afzetting (fi) (dwars doorsnede; H.E., 150x). b. detail van hetzelfde vat enkele coupes verder; hier zijn naast fibrine schuimcellen (pijlen) te zien (HE, 375x).



Daarnaast werden in mesenteriaal arteriën, en een enkele maal ook in een nierarterie, veranderingen gezien, die bekend staan als de zogenaamde „periarteritis nodosa-like lesions”. In het hart van de oude rat werden regelmatig kleine bindweefselhaardjes aangetroffen zonder dat hiervoor een duidelijk aanwijsbare oorzaak was te vinden. In proeven, waarbij de late gevolgen van verschillende soorten ioniserende straling (röntgen, splijtingsneutronen) bij de rat werden nagegaan, werden geen andere afwijkingen gevonden dan de boven beschreven lesies. Ook de frequentie hiervan leek niet toegenomen te zijn. Volgens de literatuur is diëtair inductie van atherosclerotische vaatveranderingen bij muis en rat niet goed mogelijk. Er kan dan ook gesteld worden dat muis en rat niet geschikt zijn voor experimenteel atherosclerose-onderzoek.

Apen

Zonder in details te willen treden over de indeling van primaten — de orde van zoogdieren waartoe naast de halfapen en de apen ook de mens gerekend wordt — kan gezegd worden, dat in de vaten van apen afwijkingen gevonden worden, die vergelijkbaar zijn met atherosclerotische vaatveranderingen bij de mens. Deze zijn gevonden zowel bij pas gevangen apen als bij apen die reeds geruime tijd in gevangenschap hebben doorgebracht. In het laatste geval betreft het dikwijls in een dierentuin gehouden dieren. In beide gevallen zijn de leeftijden van de dieren alleen bij benadering bekend. Daarnaast is het mogelijk gebleken om door middel van bepaalde diëten bij de aap atherosclerose op te wekken. Opgemerkt dient te worden dat bij de aap, evenals bij bijna alle onderzochte diersoorten, atherosclerose van de aorta doorgaans niet gepaard gaat met het gelijktijdig optreden van coronairarterie veranderingen. Het myocard infarot, een van de meest gevreesde complicaties van atherosclerose bij de mens, wordt dan ook bij proefdieren weinig gezien. Of bestraling invloed heeft op het optreden van atherosclerose bij de aap is niet bekend. Er zijn tot op heden nog maar weinig langlopende proeven met apen verricht. In het Primatecentrum TNO is in principe de mogelijkheid aanwezig om in de nabije toekomst gerichte onderzoeken op het gebied van het natuurlijk voorkomen van atherosclerose bij de aap te gaan verrichten. Twee van de vier soorten apen (squirrel monkey, rhesusaap, baviaan, chimpansee), die gevoelig blijken te zijn voor het natuurlijk ontstaan van atherosclerose, te weten de rhesusaap en de chimpansee, zijn hier aanwezig. Van de eerstgenoemde soort bestaat reeds geruime tijd een vrij omvangrijke eigen fok. Het werken met eigengefokte dieren biedt velerlei voordelen. Terwijl de leeftijd en familierelaties bekend zijn en de dieren een goede gezondheid hebben, zijn daarnaast het dieet en het milieu gestandaardiseerd. De mogelijkheid bestaat nu om geïnterformeerd te raken over wat onder standaardcondities bij in gevangenschap levende apen op verschillende leeftijden aan atherosclerotische vaatafwijkingen voorkomt. Daarnaast kan in experimentele opstellingen bijvoorbeeld de invloed van dieet en

stress op deze afwijkingen nagegaan worden. Tevens is het wenselijk, daar de gegevens hierover in het algemeen schaars zijn (Vastesaeger, 1968), om de bloedspiegels voor serumlipiden te vervolgen en na te gaan of er een correlatie bestaat tussen verhoogd gehalte aan serumlipiden en atherosclerose bij deze dieren. Uiteraard kan dit alleen geschieden in langlopende experimenten. Toch lijkt het verantwoord om dergelijke studies te overwegen. Immers, de bij de aap gevonden afwijkingen zijn identiek aan die van de mens, terwijl aap en mens tot dezelfde orde der zoogdieren gerekend worden. Interpretatie van gegevens gevonden bij de aap lijkt dan ook meer van belang te zijn voor de mens dan bijvoorbeeld die van uitkomsten van experimenten gedaan met konijnen, een veelvuldig gebruikte diersoort bij experimenteel atherosclerose-onderzoek. Op de waarde van het konijn als proefdier voor experimenteel atherosclerose-onderzoek zal nader teruggekomen worden.

Van de niet bij de Werkgroep Experimentele Gerontologie TNO, het Radiobiologisch Instituut TNO en het Primatecentrum TNO gebruikte proefdieren zullen hieronder in het kort nog enkele vermeld worden. Deels omdat ze veelvuldig voor dit onderzoek gebruikt worden, deels omdat ze misschien nieuwe mogelijkheden bieden.

Hond

Opmerkelijk is dat bij de hond vrijwel geen atherosclerose voorkomt. En dat niettegenstaande het feit dat de gebruikte voeding vaak geheel overeen komt met hetgeen de mens zelf consumeert.

Konijn

Konijnen worden veelvuldig gebruikt voor experimenteel atherosclerose-onderzoek. Bij deze proeven krijgen de dieren een cholesterolrijk dieet, wat aanleiding geeft tot een hypercholesterolaemie van het bloed. In vrij korte tijd, enkele maanden, ontstaan veranderingen van de aorta. Bij histologisch onderzoek blijken deze niet geheel identiek te zijn aan de atherosclerotische veranderingen van de menselijke aorta (Constantinides, 1965). Bij konijnen komt geen spontane atherosclerose van de aorta voor (Haust et al, 1965). Wel zijn spontane lesies van de aorta gevonden die doen denken aan de veranderingen die gezien worden bij de sclerose van Mönckeberg. Bovenstaande wil niet zeggen dat het konijn geen geschikt proefdier voor experimenteel atherosclerose-onderzoek zou zijn. Integendeel, uit het vele verrichte experimentele werk met deze dieren is gebleken dat de konijneaorta een goed modelsysteem is om de gevolgen van vaatbeschadiging en het mechanisme van hyperlipaemie te bestuderen. Deze twee mechanismen zijn wel in verband gebracht met de mogelijke onstaanswijze van atherosclerose. De gevolgen van bestraling van vaten en hart bij hypercholesterolemische konijnen zijn weergegeven in het proefschrift van De Boer (1963). Voor vergelijkend atherosclerose-onderzoek, waarbij meer fysiologische factoren bestudeerd worden, is het konijn mijns inziens echter een minder geschikt proefdier. Het is moeilijk om konijnen lang in leven te houden en dus om langlopende experimenten met deze dieren te doen. Uit

de enkele gegevens verkregen bij oude konijnen blijkt daarnaast dat spontane atherosclerose bij deze dieren niet voorkomt.

Vogels

Bij de kip, duif en kalkoen komen spontaan afwijkingen voor die enige overeenkomst vertonen met de atherosclerose van de mens. Ook bij andere vogelsoorten is dit waargenomen (o.a. papegaai).

Hoewel een deel van bij deze dieren gevonden vaatveranderingen lijkt op atherosclerose van de mens, zijn er toch ook duidelijke morfologische verschillen; men kan dan ook beter spreken over lipoid bevattende intima-lesies van de aorta. Met de mogelijkheid dat deze dieren voordeel kunnen bieden om bepaalde aspecten van het atheroscleroseprobleem, bijvoorbeeld het vaatwandmetabolisme, te bestuderen, dient rekening gehouden te worden.

Varken

Bij het varken komt spontaan atherosclerose voor, die zowel in morfologisch opzicht, alsook wat betreft distributie over de vaten — aorta, coronairarteriën, hersenarteriën — sterk gelijkt op wat bij de mens gezien wordt. Een nadeel van het varken als proefdier is zijn omvang, de mede daardoor benodigde ruimte en de hoge kosten van onderhoud, zeker in de langlopende proeven. Een deel van deze bezwaren kan waarschijnlijk ondervangen worden door het gebruik van het miniaturvarken, de

zogenaamde „minipig”. Deze dieren zouden voor wat betreft vaatafwijkingen niet verschillen van hun grotere broer of zuster, het varken.

Walvis

Vermeld dient nog te worden dat bij de walvis (killer whale) vrij ernstige atherosclerose is gevonden. Bij de *dolfijn* daarentegen worden slechts minimale afwijkingen gevonden.

Samenvattend kan gesteld worden dat bij de aap, het varken en de walvis (killer whale) spontane progressieve vaatveranderingen gevonden worden die gelijken op de menselijke atherosclerose. De rat, de muis, het konijn en de hond ontwikkelen zelden of nooit natuurlijke afwijkingen die lijken op atherosclerose van de mens. Bij vogels worden lipoid bevattende intima-lesies gevonden, die deels gelijkenis tonen met de menselijke atherosclerose, deels ervan afwijken. Het lijkt dan ook gerechtvaardigd om in de komende jaren aandacht te gaan besteden aan het voorkomen van spontane atherosclerose bij apen. Te meer daar de rhesusaap en de chimpansee, twee soorten bij wie natuurlijke atherosclerose voorkomt, aanwezig zijn in het Primatencentrum TNO. Dat bij dit onderzoek verschillende geïnteresseerde onderzoekers zullen gaan samenwerken lijkt gezien de kosten van dit onderzoek en de ruimtelijke problemen wenselijk. Tenslotte dient de minipig als potentieel proefdier voor experimenteel atheroscleroseonderzoek niet vergeten te worden.

Literatuur

Boer, W. G. R. M. de: Experimentele en therapeutische Röntgenbestraling als oorzaak van arteriële en cardiale beschadiging. Proefschrift Groningen, 1963.

Bojanus, L. H.: *Anatome Testudinis Europaeae*. Vilnae, 1819, I; 1819-1821, II.

Classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group. W.H.O. techn. Rep. Ser. 143 1958.

Comparative atherosclerosis: The morphology of spontaneous and induced atherosclerotic lesions in animals and its relation to human disease.

Eds. J. C. Roberts, jr. and R. Straus. Hoeber Medical Division, Harper and Row, Publishers, New York, 1965.

Constantinides, P.: Experimental atherosclerosis in the rabbit.

In: Comparative atherosclerosis. Eds. J. C. Roberts, jr. and R. Straus. Hoeber Medical Division, Harper and Row, Publishers, New York, 1965, blz. 276.

Greil, A.: Beiträge zur vergleichenden Anatomie und Entwicklungsgeschichte des Herzens und des Truncus arteriosus der Wirbeltiere. Morph. Jb., 31, 123, 1903.

Haust, M. D. and More, R. H.: Spontaneous lesions of the aorta in the rabbit.

In: Comparative atherosclerosis. Eds. J. C. Roberts, jr. and

R. Straus. Hoeber Medical Division, Harper and Row Publishers, New York, 1965, blz. 255.

Hollander, C. F.: Cartilaginous focus at the base of the non-coronary semilunar valve of the aorta in rats of different ages.

Exp. Geront. 1968, ter perse.

Hueper, W. C.: Cartilaginous foci in the hearts of white rats and mice.

Arch. Path., 27, 446, 1939.

Levij, I. S. and Ungar, H.: Severity of atherosclerosis in yemenite jews in relation to their length of residence in Israel.

Israel. J. Med. Sci. 3, 453, 1967.

Vastesaeger, M. M.: The contribution of comparative atherosclerosis to the understanding of human atherosclerosis.

J. Atheroscler. Res. 8, 377, 1968.

Wexler, B. C.: Spontaneous coronary arteriosclerosis in repeatedly bred male and female rats.

Circulat. Res. 14, 32, 1964.

Wexler, B. C., Judd, J. T., Cox, G. E., Lutmer, R. F. and Saroff, J.: Spontaneous arteriosclerosis in repeatedly bred male and female rats.

In: Colloque international de Pathologie Experimentale; Le rôle de la Paroi Arterielle dans l'Atherogenèse. Paris, C.N.R.S., 1967. p. 295.