

In vitro-methoden: alternatief - of toch niet helemaal?

Jan van der Valk

NCA, dept. Dier in Wetenschap en Maatschappij, Faculteit Diergeneeskunde UU,
Yalelaan 2, 3584 CM, Utrecht

Inleiding

Cel- en weefselkweekmethoden (*in vitro*-methoden) worden vaak ontwikkeld en toegepast als alternatieven voor dierproeven; om dierproeven te vervangen en verminderen. Toch kunnen aan het gebruik van *in vitro*-methoden ethische en wetenschappelijke problemen kleven. Ik geef hier een kort verslag van twee workshops die hierop zijn ingegaan.

Wat is het probleem bij in vitro-methoden

In vitro-methoden worden gebruikt om biologische, farmacologische en fysiologische activiteiten te bestuderen aan cellen en weefsels. Daarnaast worden celkweken steeds meer toegepast voor het produceren van hormonen en vaccins. Hoewel niet alle *in vitro*-methoden proefdieren besparen, zijn cel- en weefselkweken belangrijk voor het vervangen en verminderen van dierexperimenteel onderzoek.

Zoogdiercellen worden over het algemeen gekweekt onder gestandaardiseerde omstandigheden, waarbij de temperatuur op 37°C en het CO₂-gehalte op 5% wordt gehouden, en de zuurgraad wordt gecontroleerd. Om een goede reproduceerbaarheid te bereiken is de samenstelling van het kweekmedium essentieel.

Het meest basale en simpele medium is de zogenoemde (Ringers)-zoutoplossing. Om de cellen en weefsels langer in leven te houden zijn ook nog pH-buffers en voedingsstoffen nodig: Eagle's Minimal Essential Medium (Eagle's MEM). Een gemodificeerde variant, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) wordt tegenwoordig veel gebruikt.

Om cellen niet alleen in leven te houden, maar daarnaast ook nog te laten vermenigvuldigen wordt vaak serum toegevoegd, en dan met name het serum van

ongeboren kalveren (Fetal Calf Serum: fcs). Serum bevat o.a. groeifactoren, eiwitten, vitaminen, sporenelementen, en hormonen.

De belangrijkste functies van serum bij celweek zijn:

- 1 stimuleren van celvermenigvuldiging en celdifferentiatie door hormonen en groeifactoren
- 2 transporteren van hormonen, mineralen, sporenelementen en lipiden door transporteiwitten
- 3 binden van cellen aan de bodem van de kweekschaaltjes door bindingsfactoren (o.a. extracellulaire matrix componenten)
- 4 stabiliseren van het medium door bijvoorbeeld de zuurgraad gelijk te houden.



Utrecht 2003
internationale
workshop over sera
– FCS

Het gebruik van serum, en met name fcs, is controversieel. In 2003 is daar een internationale workshop over gehouden in Utrecht. Het bleek dat het opvangen van bloed voor de productie van fcs veel ongerief teweeg kan brengen bij het ongeboren kalf. Iets dat niet wenselijk is bij een methode waarmee we dierproeven willen vervangen of verminderen. Daarnaast varieert de samenstelling van het serum tussen batches, en dat komt de reproduceerbaarheid van experimenten niet ten goede. Ook kan het serum besmet zijn, denk bijvoorbeeld aan mycoplasma en prionen (bse). Daarom wordt bij de productie van hormonen en vaccins voor toepassing bij de mens via *in vitro*-methoden het gebruik van fcs ten strengste afgeraden. Als laatste is de precieze samenstelling van het serum onbekend. We weten dus niet welke factoren in het serum de experimenten beïnvloeden. We werken daarom het liefst met een volledig chemisch gedefinieerd medium, waarvan de samenstelling volledig bekend is.

Het ethisch probleem: het kalf kan ongerief ervaren

Over het algemeen is fcs een bijproduct van extensieve veehouderij in landen als Australië, Nieuw-Zeeland, Brazilië, USA, Argentinië en Rusland, waar stieren en koeien in kuddes leven en waar een kudde vaak ook in zijn geheel in een keer wordt geslacht. Een gedeelte van de koeien is drachtig op het moment van slach-

ten. Na de slacht van de drachtige koe wordt de uterus met het ongeboren kalf naar een speciale ruimte gebracht waar het bloed wordt opgevangen door het dier te verbloeden of door het bloed met behulp van een [hypodermische] naald rechtstreeks uit het pompende hart op te vangen. Vervolgens zal het bloed stollen waarna het wordt gecentrifugeerd en het serum wordt afgescheiden. Op deze manier kan ongeveer 50% van het serum uit het bloed worden geïsoleerd. Afhankelijk van de leeftijd levert een foetus 150 ml (3 maanden oud) tot 550 ml serum (9 maanden oud). De wereldwijde productie van serum is geschat op 500.000 liter per jaar. Dit komt neer op verbloeden van 1 tot 2 miljoen foetussen per jaar. Vanaf het moment dat de koe 5¹/₂ maand drachtig is, is de foetus in principe in staat bewust te zijn en te lijden onder schadelijke prikkels. Aangezien foetaal



bloed wordt getapt in de laatste 3 maanden van de dracht heeft een groot gedeelte van de foetussen kans op ongerief bij het winnen van hun bloed. Alleen als door zuurstoftekort de hersenactiviteit bij de foetus is gestopt, is de kans op ongerief te verwaarlozen. Bij het verbloeden van de moederkoe zal de bloedvoorziening naar de uterus snel stoppen, waardoor het EEG van de foetus vervlakt. Door pas minimaal 5 minuten na het verbloeden van de moederkoe te starten met het opvangen van het bloed van de foetus, is er voldoende zekerheid dat de hersenactiviteit bij de foetus is gestopt. Wanneer de foetus met uterus

en al is verwijderd moet vervolgens worden vermeden dat de foetus kan gaan ademen, want dan zou het dier weer bij bewustzijn kunnen komen. Ademhaling kan worden voorkomen door de kop in de uterus te houden of de trachea dicht te drukken. Mocht de foetus toch hebben kunnen ademen, dan zal deze met een schietmasker of op andere wijze hersendood gemaakt moeten worden voordat de hartpunctie plaatsvindt.

Alleen onder deze omstandigheden kan op een ethisch verantwoorde manier foetaal bloed voor de productie van foetaal kalfserum worden opgevangen.

Echter, er is geen enkele controle op het toepassen van deze procedures en er is geen enkele garantie dat deze 'safeguards' worden toegepast. De serumproducerende bedrijven houden dan ook wijselijk hun mond als het over deze kwestie gaat.

Oplossingen

De noodzaak van fcs bij *in vitro*-methoden wordt langzamerhand minder. Voor een aantal celtypen zijn media ontwikkeld waarbij de cellen ook zonder fcs kunnen groeien:

- 1 Serumvrij medium: dit medium maakt geen gebruik van serum, maar kan o.a. proteïnen bevatten van dierlijke of plantaardige oorsprong, en is daarom niet chemisch gedefinieerd (zie 4.).
- 2 Proteïnevrij medium: Proteïnevrije media bevatten geen hoogmoleculaire proteïnen

of proteïne fracties, maar wel peptide fracties (protein-hydrolysaten), en zijn daarom niet chemisch gedefinieerd. Deze media worden vaak gebruikt bij de productie van recombinant-eiwitten en de isolatie van cellulaire producten (als bijvoorbeeld, monoclonale antilichamen).

- 3 Dierlijke productenvrij medium: Deze media bevatten geen componenten van dierlijke of menselijke oorsprong. Ze zijn niet per definitie chemisch gedefinieerd omdat ze nog wel componenten kunnen bevatten die van planten of gisten afkomstig zijn.
- 4 Chemisch gedefinieerd medium: Deze media bevatten geen componenten met een onduidelijke samenstelling. Componenten kunnen afkomstig zijn van planten of dieren, maar zijn óf gezuiverd, of ze zijn recombinant-producten (bij voorkeur).

Wetenschappelijk gezien heeft het chemisch gedefinieerde medium de voorkeur en om ethische redenen heeft het dierlijke productenvrij medium de voorkeur. En zeker als de laatste dan ook nog chemisch gedefinieerd is, hebben we, wetenschappelijk en ethisch gezien, het ideale medium.

Een probleem is echter dat verschillende celtypen verschillende eisen stellen aan de compositie van het medium. Er is nog geen gestandaardiseerde mediumtoevoeging die voor alle celtypen geschikt is. Met andere woorden, voor elk celtype moet opnieuw worden uitgevonden wat de ideale samenstelling is van het medium om de cellen te laten groeien en waarbij hun karakteristieke eigenschappen behouden blijven.

Kopenhagen
2009
internationale
workshop
over FCS-vrij
medium

In november 2009 werd in Kopenhagen een workshop georganiseerd om handvatten te bieden voor de ontwikkeling van een medium voor een willekeurig celtype [waarvoor dit nog niet bestaat]. Er werd een stappenplan opgesteld dat het maken van een FCS-vrij medium vergemakkelijkt. Verder is beschreven op welke wijze cellen aan een nieuw medium geadapteerd kunnen raken. De resultaten van deze workshop zullen binnenkort worden gepubliceerd.

Voor een aantal celtypen bestaan gelukkig al wel serumvrije media. Om de informatie hierover makkelijker toegankelijk te maken is een aantal databestanden beschikbaar.

Het streven is nu de databestanden uit te breiden met volledige recepten van serumvrije media. Daarnaast zal er meer uitwisseling van recepten op congressen en bijeenkomsten moeten plaatsvinden om het gebruik van serumvrije media te stimuleren.

Uiteindelijk slaan we met het gebruik van serumvrije en, bij voorkeur, chemisch gedefinieerde *in vitro*-methoden twee vliegen in één klap; de behoefte aan FCS wordt minder en daardoor het mogelijke ongerief bij het ongeboren kalf tijdens de slacht. Hierdoor hebben we een werkelijk alternatieve methode en krijgen we betere en betrouwbaardere *in vitro*-methoden.

Dankwoord

De eerste workshop werd georganiseerd op initiatief van Vera Baumans en Jan van der Valk met financiële ondersteuning van ZonMw, de Swedisch National Board for Laboratory Animals en de European Society of Toxicology In vitro (ESTIV).

De laatste workshop was een initiatief van de Nederlands-Belgische Vereniging voor In vitro Methoden (INVITROM: www.invitrom.org), in samenwerking met ESTIV (www.estiv.org) en het Danish in vitro toxicology network. De workshop werd gesponsord door het ZonMw-programma 'Dierproeven begrensd', de DoerenkampZbinden Foundation en de Deense dierenbeschermingsorganisatie Forsøgsdyrenes Værn.

Iris Boumans en Marjolein van Boxel hebben het manuscript kritisch gelezen en aanpassingen voorgesteld om het leesbaarder te maken.

Dit verslag vat de rapporten samen van de genoemde publicaties en workshops. Verdere referenties zijn bij de auteur op te vragen of in de workshoprapporten te vinden.

Literatuur

- 1 Jochems C E, van der Valk J B, Stafleu F R, Baumans V (2002). *The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem?* ATLA, 30(2; - 0261-1929), 219-227
- 2 Van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G et al. (2004). *The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture.* Toxicology in vitro, 18(1), 1-12.
- 3 Van der Valk J, van Zutphen BFM (2004). *Reduction through education: The insight of a trainer.* ATLA, 32 (Suppl. 2), 1-4.

Links naar databestanden

www.goodcellculture.com/
www.sefrec.com
www.focusonalternatives.org.uk/PDFs/FCS-free%20table%20May%2009.pdf

Mijn fascinatie

'werken aan maatschappelijke impact'

Bedrijven en overheid helpen te innoveren. Hoogwaardig onderzoek doen, gericht op praktische adviezen en toepassingen waar de opdrachtgever écht iets aan heeft. Dat vind ik fascinerend. Bij TNO werk ik aan opdrachten van nationale en internationale klanten. Ik werk projectmatig, zelfstandig én in teamverband. Ik krijg alle kansen om initiatieven te nemen, om mezelf te ontplooiën en om door te groeien.

De business unit Biosciences te Leiden is op zoek naar:

Dierverzorg(st)er/Biotechnicus

Binnen de business unit Biosciences van TNO Kwaliteit van Leven, die onderzoek verricht naar ontstekings- en degeneratieve ziekten, vasculaire- en metabole ziekten en weefselherstel, werk jij mee aan de uitvoering van dierexperimenteel onderzoek. Je werkt in een klein team bij het verzorgen van de dieren en het handhaven van hun welzijn, het schoonmaken van de bakken, het uitvoeren van biotechnische handelingen zoals het doseren van kleine proefdieren en het assisteren bij een breed scala aan ziektemodellen en operaties. Daarnaast verricht je administratieve taken en je denkt mee over continue verbetering van procedures en kwaliteitssystemen. In de loop van 2010 zal er een nieuwe dierfaciliteit in gebruik genomen worden waar we als team blijven werken aan dierenwelzijn en de kwaliteit van ons onderzoek.

Jouw fascinatie?

Wij zoeken een enthousiaste biotechnicus/dierverzorg(st)er die affiniteit heeft met kleine proefdieren. Je hebt een afgeronde MBO opleiding en bent in het bezit van een artikel 12 bevoegdheid aangevuld met enkele jaren relevante werkervaring. Vanzelfsprekend werk je nauwgezet en kun je goed in teamverband functioneren.

Ben je geïnteresseerd? Voor meer informatie kunt je contact opnemen met de heer Dr. J. de Groot, 071-5181384. Solliciteren? Ga dan naar onze website en wij ontvangen graag jouw motivatiebrief en CV.

werkenbijTNO.NL

