

# In vitro-methoden: een natuurlijk alternatief voor dierproeven?

Jan van der Valk

3V-Centrum Utrecht Life Sciences, Departement Dier in Wetenschap en Maatschappij,  
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, J.vanderValk@uu.nl

## Inleiding

Ondanks dat de zorg voor proefdieren toeneemt, en we er alles aan doen om het gebruikte aantal en het ongerief naar beneden te brengen, staat het buiten kijf dat iedereen zo min mogelijk proefdieren wil gebruiken. Niet alleen om ethische redenen. Ook wetenschappelijke en economische aspecten zijn belangrijke drijfveren om dierproeven terug te dringen.

Maar het is dan wel belangrijk om goede modellen te hebben die de juiste antwoorden op de wetenschappelijke vragen kunnen geven. Cel- en weefselkweekmethoden, de zogenoemde *in vitro*-modellen, worden vaak als eerste genoemd als modellen die dierproeven kunnen vervangen of verminderen. Maar wat verstaan we onder *in vitro*-methoden, is het wel zo eenvoudig om met cellen en weefsels te werken en benaderen ze wel de ‘natuurlijke’ situatie? Ik wil in dit artikel daar een tipje van de sluier over oplichten.

## Wat verstaan we onder in vitro-methoden?

Hoewel *in vitro* letterlijk ‘in glas’ betekent, worden *in vitro*-methoden tegenwoordig voornamelijk in plastic uitgevoerd. Het is een verzamelnaam voor methoden waarmee cellen en weefsels buiten het lichaam onder gecontroleerde omstandigheden in leven worden gehouden voor o.a. wetenschappelijk onderzoek, screening van stoffen, productie van bijvoorbeeld hormonen en vaccins, fertilisatie en diagnostische doeleinden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van primaire cellen, cellijnen, weefsels en gereconstrueerde weefsels.

## Primaire cellen

Primaire cellen zijn cellen verkregen uit een dierlijke of menselijke donor. De cellen worden geïsoleerd en in kweek gebracht. Het voordeel van het werken met primaire cellen is dat ze de meeste van hun *in vivo*-eigenschappen behouden. Het nadeel is dat deze cellen, afhankelijk van het oorspronkelijk weefsel, niet of beperkt zijn te vermenigvuldigen en over het algemeen weinig homogeen zijn. Zenuwweefsel, bijvoorbeeld, deelt niet en is slechts enkele dagen in kweek te houden. Huidcellen daarentegen kunnen over het algemeen wel een aantal malen delen voordat ze hun eigenschappen gaan verliezen (de-differentiëren). Daarnaast verliezen ze op een gegeven moment ook de mogelijkheid tot delen, ook wel senescence genoemd. Uiteindelijk zal er weer nieuw donormateriaal nodig zijn voor verder onderzoek. »



Afbeelding 1. Leverplakjes voor *in vitro*-onderzoek (G. Groothuis, Universiteit Groningen, Groningen)

## Cellijnen

Cellijnen, ook wel geïmmortaliseerde cellen genoemd, zijn cellen die onder gecontroleerde omstandigheden zich in kweek blijven vermeerderen. De cellen binnen een kweek zijn, als het ware, klonen van elkaar. Cellijnen worden o.a. ontwikkeld uit tumoren. De meest bekende cellijn is de HeLa-celijn, de eerste humane cellijn. De Hela-cellen zijn in 1951 geïsoleerd uit een baarmoederhalskanker en worden nog steeds gebruikt. Andere cellen kunnen tot immortalisatie aangezet worden door transfectie met bepaalde genen met behulp van een virus of een plasmide. Het voordeel van cellijnen is dat ze een continue bron van cellen vormen en dat geen donoren nodig zijn. De celpopulaties zijn redelijk homogeen en goed uit te wisselen met andere laboratoria. Het nadeel van cellijnen is dat de cellen gemuteerd zijn en daardoor eigenschappen kunnen missen van de primaire (*in vivo*) cel. Het is immers een biologisch basisprincipe: alles wat gedifferentieerd is deelt niet meer goed, alles wat goed deelt is tamelijk ongedifferentieerd.

## Weefsels

Ook is het tegenwoordig mogelijk om weefsels in kweek te houden. De stukjes weefsel kunnen niet te groot zijn (Afb. 1). Omdat er geen bloedtoevoer is kunnen er bij dikke plakken weefsel problemen ontstaan met de uitwisseling van voedingsstoffen en afvalproducten. Ook zijn er ontwikkelingen die het mogelijk maken weefsel te reconstrueren uit de oorspronkelijke cellen. Het meeste succes is geboekt met de huid. Uit een donorhuid worden de verschillende celtypen geïsoleerd en vervolgens in kweek vermeerderd. Daarna worden de cellen weer samengebracht in een kweekbakje en vormen deze weer een huid.

## Voordelen en uitdagingen van *in vitro*-methoden

Het mag duidelijk zijn dat het gebruik van *in vitro*-methoden vele voordelen heeft, niet in de laatste plaats omdat we geen dieren nodig hebben, of alleen als donor. Resultaten zijn direct verkrijgbaar van de doelcel of het doelorgaan, zonder de ruis van effecten op andere organen of weefsels, waardoor een gevoeliger onderzoekssysteem ontstaat en resultaten beter te interpreteren.

ren zijn. De condities waaronder de cellen en weefsels groeien, en waaronder de experimenten worden uitgevoerd zijn goed te controleren en te manipuleren: temperatuur, leefomgeving (kweekvloeistof en atmosfeer binnen een kweekstoof) en de te manipuleren eigenschappen. Door de grote gevoeligheid hebben we minder teststof nodig en krijgen we ook sneller resultaten. Dat laatste heeft binnen de industrie geleid tot high-throughput-testen: veel stoffen kunnen binnen een zeer korte tijd, vaak automatisch, op bepaalde eigenschappen worden getest met kleine hoeveelheden van de stof.

Maar *in vitro*-methoden hebben ook hun beperkingen. De belangrijkste is wel dat je niet met een compleet lichaam (mens of dier) werkt en daardoor geen interacties tussen organen hebt. Een stof die veilig is gebleken op cellen, kan toch toxisch zijn *in vivo* omdat de stof wordt gemetaboliseerd door bijvoorbeeld de lever en de metaboliëten toxisch zijn. Verder missen we nog informatie over de verspreiding van een stof over het lichaam na blootstelling (biokinetiek). Vandaar dat we meestal niet alleen op resultaten van *in vitro*-methoden afgaan maar aanvullende experimenten doen. We kunnen een stof ook blootstellen aan levercellen om te kijken of de stof wordt gemetaboliseerd en welke effecten de metaboliëten hebben. De biokinetiek kan van sommige stoffen worden voorspeld door computerprogramma's die zijn gevoerd met gegevens van vergelijkbare stoffen waarvan de biokinetiek al bekend is.

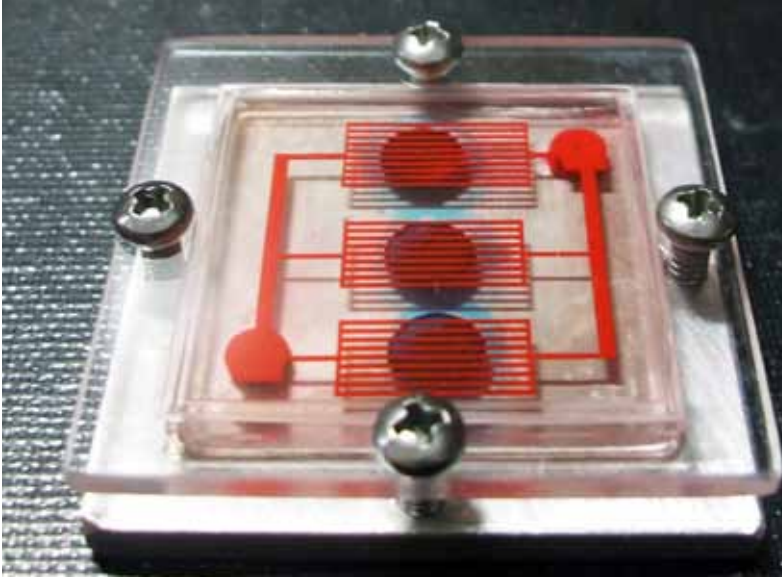
## Celeigenschappen

De vraag is of cellen nog wel hun *in vivo*-eigenschappen behouden als ze in een kunstmatige omgeving in leven worden gehouden zonder interactie met omringende cellen. Een extra probleem met cellijnen is ook dat deze gemuteerd zijn en dus, in zekere zin, al anders zijn dan de *in vivo*-cellen. Vandaar dat het essentieel is om goed te bekijken of de eigenschappen die je wilt bestuderen overeenkomen met de *in vivo*-situatie.

Het nadeel van cellijnen is ook dat ze na een hoeveelheid delingen gaan veranderen. Vandaar dat een deel van de 'jonge' cellen wordt ingevroren om na een bepaalde tijd de kweek weer opnieuw uit op te starten. Verder blijft het zaak te controleren of de cellijn nog wel de cellijn is die je wilt bestuderen. Het is namelijk gebleken dat ongeveer 20% van de cellijnen vervuild zijn, of zelfs overgenomen zijn door andere cellijnen. De HeLa-celijn (Biotechniek 49/6, 261-262) is zo'n agressieve snel delende cellijn die al veel cellijnen heeft overgroeid.

## Cellen kweken

Veel celkweken worden uitgevoerd in schaaltes waarin de cellen tweedimensionaal op de bodem groeien en waarvan het kweekmedium enkele malen per week wordt verversd. Je kunt je afvragen of een tweedimensionaal systeem wel relevant is. Er gaan steeds meer stemmen op om cellen driedimensionaal te laten groeien. Dit gebeurt o.a. door de cellen in suspensie te laten groeien waar ze in een medium wervelen en klompjes gaan vormen. Maar in toenemende mate worden cellen gekweekt op zgn. scaffolds, 3D-structuren waarop de cellen kunnen groeien. Dit is vaak sponsachtig materiaal, te vergelijken met de extracellulaire matrix. Het is gebleken dat cellen op deze manier langer overleven, en meer de *in vivo*-cellen representeren dan wanneer ze groeien in een 2D-schaaltje. Maar dan moeten ook andere *in vivo*-situaties beter worden nagebootst. In een 2D-cultuur komen cellen in een vers kweekmedium terecht waarin ze een aantal dagen mogen overleven. Vervolgens wordt het medium verversd, de cellen krijgen een shock te verduren van de overgang van een uitgeput medium met afvalstoffen naar een vers medium vol met voedingsstoffen. Niet echt fysiologisch. Op endotheelcellen na, zijn cellen gewend aan een rustige continue uitwisseling van stoffen. Om de *in vivo*-situatie nu beter te benaderen zijn flow-kamertjes ontwikkeld waarin cellen continue worden blootgesteld aan vers medium en tegelijkertijd afvalproducten worden afgevoerd. Het bleek nog ingewikkeld om de juiste verhouding te vinden tussen voldoende aan- en afvoer van stoffen en de vloeistofsnelheid. Alleen »



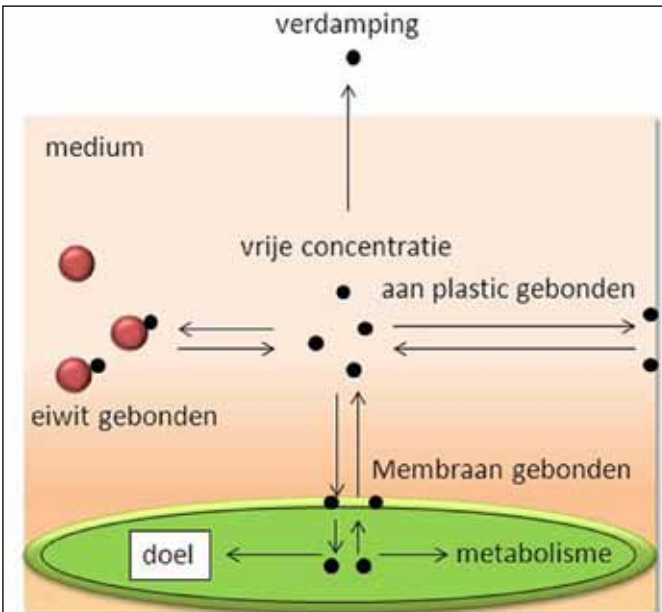
Afbeelding 2.  
Een voorbeeld van een organ-on-a-chip waarbij in elk van de drie compartimenten cellen van verschillende weefsels kunnen worden gebracht om de onderlinge interactie te bestuderen, o.a. na blootstelling van stoffen.  
(J. H. Sung, Shuler lab, Cornell University)

endotheelcellen zijn gebouwd op een hoge snelheid van vloeistoffen, andere stoffen krijgen last van de zgn. 'shear stress'. De huidige kamertjes geven maken het mogelijk door ze met elkaar te verbinden, om meerdere celkweken met elkaar in contact te brengen (Afb. 2). Zo kunnen stoffen eerst over levercellen geleid worden om ze te laten metaboliseren om ze vervolgens over de doelcellen heen te leiden om de effecten van de metabolieten te bestuderen. Men heeft zelfs de systemen zodanig geminiaturiseerd dat men meerdere celtypes via een netwerk van kanaaltjes met elkaar in contact kan brengen: 'lab on a chip', ook wel 'human on a chip' en 'body on a chip' genoemd.

## Medium

Natuurlijk is niet alleen de structuur waarlangs de cellen groeien essentieel, ook het medium waarin de cellen groeien en overleven moet natuurgetrouw zijn. Voor groei, en dus celdeling,

zijn groeifactoren belangrijk. Bijna alle gangbare cellen groeien in medium met foetaal kalfserum (FCS). Dit is serum gewonnen uit bloed van ongeboren kalveren, met veel groeifactoren, maar slechts weinig antistoffen en andere 'verontreinigingen'. Er zijn diverse problemen met het gebruik van FCS (Biotechniek 49/2, 69-75) vandaar dat men probeert over te stappen op een vervanger. Tot nu toe blijkt voor elk celttype een andere serumvervanger nodig. Er zijn echter claims van universele serumvervangers en we kijken uit naar publicaties van resultaten met deze nieuwe producten. De nieuwe serumvervangers geven ook inzicht in de aanwezige stoffen in het medium, zodat we ook kunnen nagaan of er stoffen inzitten, vaak eiwitten, die binden aan bijvoorbeeld een te testen stof. Dit zou namelijk de vrije concentratie van de teststof in het medium kunnen



Afbeelding 3. De verschillende factoren die de vrije concentratie van een stof bepalen als van een in vitro-methode gebruikt wordt gemaakt. (N. Kramer, IRAS, Utrecht)



verminderen. Erg belangrijk als we de werking of toxiciteit van een stof willen bepalen. Ook kunnen stoffen hechten aan de wanden van het kweekschaaltje, verdampen of niet functioneel binden aan cellen (Afb. 3). Kennis van deze factoren is essentieel als we de effecten van stoffen op cellen willen bestuderen.

## Extrapolatie

Het is duidelijk dat we met een schaalte cellen vanaf zitten van de *in vivo*-situatie. Zoals boven besproken missen we o.a. informatie over de biokinetiek en metabolisme. Gedragen de cellen zich wel als in *in vivo*? Veel van deze vragen worden nu al gedeeltelijk beantwoord door bovengenoemde 3D-celkweken en het ‘lab on a chip’. In een veel gevallen kan de *in vitro*- naar *in vivo*-extrapolatie ook plaatsvinden op basis van zogenoemde ‘physiologically based kinetic (PBK) modelling’. Een PBK-model beschrijft de absorptie, distributie, metabolisme en uitscheiding van een stof. Op basis van *in vitro*-effect-concentratiecurves kunnen zo *in vivo*-effect-concentratie curves worden berekend. Als men meerdere modellen gebruikt om de (toxische) eigenschappen van een stof te bepalen in de *in vivo*-situatie (één of meerdere *in vitro*-methoden, PBK modellering, fysisch-chemische methoden, etc) spreekt men van een geïntegreerde test strategie.

## Conclusie

Willen we *in vitro*-methoden in plaats van dierproeven goed gaan gebruiken, dan moeten we met een aantal essentiële zaken rekening houden. Als je met boven besproken factoren goed rekening houdt wordt dat Good Cell Culture Practice genoemd. In dit overzicht heb ik niet alle facetten van het doen van onderzoek met *in vitro*-methoden kunnen belichten. Wat ik duidelijk heb willen maken is dat ook wanneer *in vitro*-modellen worden gebruikt in het onderzoek, men goed moet nagaan of en hoe goed het model de realiteit benadert. Ofwel, er zal altijd een validatie van het model moeten plaatsvinden om te bevestigen dat het model voor de aspecten die men wil onderzoeken wel de ‘natuurlijke’ situatie benadert.

## Literatuur

1. Hartung T. Food for thought... on cell culture. *Altex* 2007, 24, 143-52
2. Coecke S, Balls M, Bowe G et al. Guidance on good cell culture practice. A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Alternatives To Laboratory Animals* 2005; 33: 261-87
3. Van der Valk J. Voor u gelezen..... Het onsterfelijke leven van Henrietta Lacks. *Biotechniek* 2010; 49: 261-62
4. Van der Valk J. *In vitro*-methoden: alternatief – of toch niet helemaal? *Biotechniek* 2010; 49: 69-75
5. Blaauboer BJ. Biokinetic modeling and *in vitro-in vivo* extrapolations. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2010; 13: 242-52
6. Meyvantsson I, Beebe, DJ. Cell culture models in microfluidic systems. *Annu. Rev. Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2008; 1: 423-49
7. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002 Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 441-48
8. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Intern J Cancer* 2010; 127, 1–8

***Met dank aan Susanne Kirchhoff voor het kritisch lezen van het manuscript.***

