



Vermindering van het aantal gebruikte proefdieren door een alternatieve methode van cryopreservatie

Marian Verhage

Nederlands Herseninstituut, m.verhage@nin.knaw.nl

Nut en noodzaak van cryopreservatie (invriezen)

In de laatste jaren is het gebruik van genetische gemodificeerde muizen drastisch toegenomen. Deze modellen worden gemaakt en in het onderzoek gebruikt. Maar zoals het in het onderzoek gaat, kunnen in korte tijd inzichten veranderen, waardoor bepaalde muizenlijnen tijdelijk niet meer zo van direct belang zijn. De kosten voor de huisvesting van proefdieren zijn hoog en worden in toenemende mate direct aan de onderzoekers zelf doorberekend. Veel muizenlijnen zijn tegenwoordig beschikbaar en worden overal ter wereld heen vervoerd. Dit neemt een risico van besmettingsgevaar met zich mee. Veelal moeten de muizenlijnen eerst gesaneerd worden, alvorens ze een proefdierfaciliteit binnen mogen. Transfer van ingevroren embryo's of sperma maakt dit eenvoudiger. Als laatste en zeker niet minder belangrijk is het veilig stellen van belangrijke proefdiermodellen voor het geval er een onverwachte besmetting van pathogenen plaatsvindt. Als een groot aantal lijnen als back-up in de stikstof zit, kan er in geval van een besmetting en gevolgde sanering snel weer worden gestart met het ontdooien van lijnen, zodat de schade voor de onderzoekers enigszins beperkt blijft.

Dilemma

Binnen het Nederlands Herseninstituut worden al sinds 2006 muizenlijnen ingevroren. Er zijn verschillende manieren om lijnen in te vriezen, zoals embryo's, sperma en ovaria. Tussen 2006 en 2013 zijn in totaal van 46 muizenlijnen embryo's ingevroren. Hiervan zijn van vier lijnen weer embryo's ontdooid en de lijn opnieuw opgestart. De keus voor alleen embryo's (acht-cellig stadium, of *morula*) ligt op technisch niveau. Als klein instituut is altijd een methode gezocht die betrekkelijk makkelijk en eenvoudig was uit te voeren, totdat er een alternatief zodanig geïmplementeerd kon worden zodat die voor ons ook haalbaar werd. De afgelopen jaren is een aantal 3V alternatieven ontwikkeld die nu in het stadium zijn (technisch uitgekristalliseerd) om in te stappen. Er zijn manuals beschikbaar gekomen met daarin werkvoorschriften die goed uitvoerbaar blijken te zijn. Voor ons instituut het moment om voor een alternatieve methode te kiezen die er voor zorgt dat het proefdiergebruik aanzienlijk zal gaan afnemen. »



Alternatief

De werkwijze van het invriezen van morula's voldeed en er is de afgelopen jaren daarom niet echt nagedacht over alternatieven in termen van vermindering en verfijning. De afgelopen jaren zijn er echter steeds meer vermindering- en verfijning alternatieven voor algemeen gebruik beschikbaar gekomen. Ik heb tijdens de Felasa meeting in juni 2013 de satelite workshop Mouse Sperm Cryopreservation gevolgd en ben in het bezit gekomen van de manual *'Reproductive Engineering Techniques in mice'* van Naomi Nakagata (1). Binnen ons instituut was geen ervaring met het invriezen van muizensperma en IVF. Na een gesprek met onze proefdierdeskundige ben ik een andere experimentele werkwijze voor het invriezen van transgene lijnen gaan proberen. De keuze om uiteindelijk sperma in te gaan vriezen is eenvoudig. Het gaat snel, mannetjes zijn beschikbaar (komen vaak uit fok en dus bewezen fertiel) en is met weinig middelen prima uit te voeren. Naast het invriezen van sperma, is er toch voor gekozen om ook embryo's in te blijven vriezen (twee-cellig). Na het invriezen van sperma wordt er ook een IVF uitgevoerd (tevens ook een controle op kwaliteit van het sperma). De bevruchte eicellen worden daarna ook ingevroren. De afweging die wij hebben gemaakt om toch ook voor embryo's te kiezen (negen dieren extra per in te vriezen lijn) is omdat er binnen ons instituut veel uitwisseling van muizenlijnen met elders plaatsvindt. Aangezien IVF niet op elk instituut kan/wordt uitgevoerd, vindt uitwisseling nog veelal plaats middels het opsturen van embryo's. Ook willen onderzoekers bepaalde lijnen die homozygoot zijn, graag homozygoot ingevroren hebben zodat na revitalisatie de lijn ook direct homozygoot is en niet een hoop extra dieren nodig zijn om de lijn weer homozygoot te krijgen middels fok (waarmee ook het voordeel verdwijnt van vermindering in proefdieren).

Wat heeft het opgeleverd

Het succesvol invriezen van een muizenlijn is van verschillende factoren afhankelijk. De juiste stimulatie van de vrouwtjes met hormonen (stam- en leeftijd-afhankelijk), plug-kwaliteit van de mannen en een goede kwaliteit van de media die nodig zijn om een lijn goed in te vriezen (pH, etc). Om binnen een veilige marge te zitten, werd een minimum hoeveelheid van 250-300 morula's (acht-cellig) aangehouden om een lijn in te vriezen. Gemiddeld waren voor het invriezen van één lijn zeven tot tien mannen en 50 tot 70 vrouwtjes nodig.

Het afgelopen jaar is hard gewerkt aan het opzetten en verbeteren van de nieuwe opzet. Momenteel zijn we in staat op met twee mannen (bewezen fertiel) en negen donorvrouwtjes een lijn in te vriezen. Er zijn middels deze vernieuwde methode momenteel 28 lijnen ingevroren. Hiervoor zijn in totaal 54 mannen en 252 vrouwtjes gebruikt. Ter vergelijking; in de voorgaande jaren werden voor het invriezen van 28 transgene muizenlijnen 196 mannetjes en 1400 vrouwtjes opgeofferd. Het ongerief van de dieren die werden opgeofferd in de oude experimentele set-up was voor de mannetjes gering en voor de vrouwtjes gering-matig (twee maal i.p. injectie). Het ongerief in de nieuwe methode is voor de mannetjes en vrouwtjes hetzelfde als in de oude proefopzet. De grote verbetering zit hem in het feit dat er in korte tijd veel meer muizenlijnen kunnen worden ingevroren, waarbij veel minder proefdieren (ca. 80%) nodig zijn!

Toekomst

De alternatieve methode is intensiever qua arbeid, maar levert uiteindelijk een grote besparing op van het aantal proefdieren en zorgt ervoor dat in korte tijd meerdere lijnen gecryopreserveerd kunnen worden. Een kleine kanttekening dient gemaakt te worden dat binnen die 28 ingevroren lijnen voor 80% van de lijnen gebruik is gemaakt van wildtype donorvrouwtjes en nog niet van homozygote of heterozygote transgene donoren. Hierbij kan de opbrengst van het aantal eicellen behoorlijk afnemen en de kans op een goede IVF ook. Daarentegen geldt dat ook voor de oude experimentele set-up. Daarbij waren gemiddeld ook meer donorvrouwtjes nodig met een homozygote-of heterozygote achtergrond. Momenteel worden er ook onbevuchte eicellen van homozygote vrouwtjes ingevroren, zodat niet in alle gevallen een IVF nodig is.

Voor het sperma invriezen, IVF, eileider transplantaties etc. geldt dat er momenteel goede en uitgekristaliseerde voorschriften zijn dat je echt over beschikbare alternatieven praat en je dus zelfs wettelijk verplicht bent hiervan gebruik te maken (of met een goed verhaal moet komen waarom je dat niet doet). Het zou dus eigenlijk binnenkort ook niet meer nodig moeten zijn om ook embryo's in te vriezen, wat een nog grotere besparing van het aantal gebruikte proefdieren zou opleveren. Als bij elk instituut de kennis en kunde aanwezig zou zijn om een IVF te kunnen doen, dan zou het volstaan om in de toekomst alleen sperma in te vriezen.

Referentie

- 1 Nakagata N (2007) *Reproductive Engineering Techniques in mice*, Transgenic Inc.

