



Het gebruik van foetaal kalfserum in cel- en weefselkweek

Afbeelding 1. Een celkweekplaat. (author: J.N. Eskra. Free to use. J.N. Eskra, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons)

Cel- en weefselkweektechnieken, ook wel in-vitro technieken genoemd, worden al veel gebruikt in het wetenschappelijk onderzoek. Hierbij kunnen processen worden onderzocht die in een organisme (mens of dier) niet mogelijk zijn. Daarbij kan in-vitro onderzoek dierproeven vervangen, of het aantal verminderen, door, bijvoorbeeld, stoffen te screenen en alleen stoffen in dieren te onderzoeken die op cel- of orgaaniveau het gewenste effect hebben. Of andersom, stoffen die een duidelijke toxische werking hebben op cellen of organen kunnen worden uitgesloten van verder onderzoek met proefdieren.

Jan van der Valk
Voormalig hoofd 3RS-centre aan de Universiteit Utrecht, contact: valk@altanex.nl

De meeste onderzoekers die met cel- en weefselkweek werken, gebruiken vrijwel zeker foetaal kalfserum (fetal calf serum: FCS, ook wel fetal bovine serum: FBS). FCS is een bijproduct van de zuivelindustrie en wordt gehaald uit het bloed dat na het slachten van ongeboren kalveren is afgenomen. Ikzelf heb FCS gebruikt in mijn vroegere wetenschappelijke werk in kweken van primaire neuronale cellen en neuroblastoomcellen. Het maakte deel uit van de routine in mijn lab, zoals dat voor veel labs geldt, en de cellen deden het er erg goed op. Welke redenen kunnen er dan zijn om het gebruik van FCS in twijfel te trekken?

FCS werd eind jaren vijftig ontdekt als celkweeksupplement door de Amerikaanse geneticus Theodore Puck [1]. Op dat moment werden dierlijke cellijnen gekweekt in media die embryo-extracten bevatten van het dier waarvan de cellen afkomstig waren. Maar wetenschappers hadden moeite om deze zogenaamde primaire celculturen te behouden en de cellen te vermenigvuldigen. Bij de zoektocht naar een beter medium dat deze primaire culturen zou kunnen ondersteunen, werd ontdekt dat zowel serumalbumine als fetuïne, een plasma-eiwit, de groei van bepaalde cellen kunnen bevorderen [2]. Puck ontdekte dat fetuïne overvloedig aanwezig is in FCS, wat leidde tot experimenten om de effectiviteit ervan als medium voor verschillende celtypen te bepalen. Die effectiviteit werd bevestigd door de resultaten [1], en de publicatie daarvan resulteerde al snel in het wereldwijde gebruik van FCS.

Bij het zorgvuldig lezen van Pucks publicatie vallen twee belangrijke, maar grotendeels genegeerde, observaties op. Ten eerste merkte Puck op dat toxische factoren in verschillende mate voorkomen in FCS en de celgroei beïnvloeden. Dus elke batch serum moet vóór gebruik worden getest. Ten tweede viel hem op dat FCS dat in de zomer en de herfst werd verkregen over het

algemeen goed werkte, maar dat 80% van het in de winter en de lente verzamelde FCS moest worden weggegooid. Deze variabiliteit in kwaliteit is niet verrassend aangezien FCS een biologisch product is, maar het heeft aanzienlijke gevolgen voor de wetenschap. Als elke afzonderlijke batch serum een ander effect op cellen zou kunnen hebben, zou dit de reproduceerbaarheid van verkregen resultaten enorm kunnen beïnvloeden.

Bovendien zijn er zorgen over het dierenwelzijn, aangezien bloed wordt afgenomen bij het ongeboren niet-verdoofde kalf door middel van een hartpunctie. Als niet alle voorzorgsmaatregelen zijn genomen, is de kans groot dat de foetus door de procedure ongerief ondervindt [3]. Dit staat op gespannen voet met de bedoeling om in-vitro methoden te ontwikkelen als vervanging van diergebruik.

Aangezien in-vitro methoden steeds vaker worden gebruikt, zijn er periodes geweest waarin de vraag naar FCS groter was dan het aanbod, wat resulteerde in hoge kosten en frauduleuze vermenging van FCS met volwassen runderserumalbumine, water en andere celgroeibevorderende additieven [4]. Dit kwam de kwaliteit niet ten goede.

Verder zien we ook een beweging naar relevantere in-vitro modellen op basis van menselijke cellen en weefsels, waarbij FCS bijzonder ongeschikt kan zijn. Dit niet alleen omdat FCS toxische bestanddelen kan bevatten, maar ook omdat FCS anders is samengesteld dan menselijk serum, waardoor cellen anders kunnen reageren.

Ik werd me bewust van deze problemen nadat ik het praktijkonderzoek had verlaten om te gaan werken bij het, toentertijd, Nederlands Centrum voor Alternatieven voor dierproeven. In 1996 vroeg mijn collega Vera Baumans mij om, samen met Frans Stafleu, supervisie te geven aan een masterstudent, Carlo Jochems. Carlo wilde onderzoeken hoe FCS tot stand kwam. Als onderdeel van zijn werk nam Carlo contact op met een breed scala aan belanghebbenden, waaronder ambassades, relevante ministeries, dierenwelzijnsorganisaties, universiteiten, op 3V gerichte organisaties en natuurlijk degenen die betrokken zijn bij het oogsten, leveren en gebruiken van FCS.

Dit project was bedoeld om zes maanden te duren, maar nam uiteindelijk zestien maanden in beslag en resulteerde in Carlo's uitgebreide thesis, 'Trade and Harvest of Livestock Sera' (Gebruik, handel en oogst van vee-sera). Hierin bespreekt hij hoe FCS wordt geogost en verhandeld; waarom en hoe het wordt gebruikt in in-vitro kweken; ethische overwegingen zoals mogelijk lijden dat wordt ervaren door gewervelde foetussen wanneer bloed wordt afgenomen; en de relevante wetgeving. Carlo bouwde ook voort op de argumenten van Puck en argumenteerde dat een meer kritische kijk op FCS en het gebruik ervan gewenst is. Hij stelde voor dat de beste oplossing zou zijn om chemisch-gedefinieerde synthetische celkweekmedia te ontwikkelen en FCS daarmee te vervangen. Zijn thesis werd in 2002 in verkorte vorm gepubliceerd in ATLA: 'The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem?' (Het gebruik van foetaal runderserum: ethisch of wetenschappelijk probleem?) [5].

Dit werk heeft ertoe bijgedragen dat FCS en mogelijke alternatieven daarvoor een belangrijk aandachtsgebied zijn geworden voor het toonaalige NCA. In 2003 hebben we dan ook een workshop georganiseerd om het mogelijke lijden van de foetus tijdens bloedafname voor FCS te bespreken en aanbevelingen te doen om dit te vermijden. De workshop bracht ook verschillende wetenschappelijke kwesties aan het licht die verband houden met het gebruik van FCS, en deelt succesvolle voorbeelden van FCS-vrije media die toen al waren ontwikkeld [3]. Dit leidde tot de organisatie van een tweede [6] en een derde [7] workshop over mogelijkheden om FCS te vervangen, en uiteindelijk tot de ontwikkeling van de FCS-vrije database (fcs-free.org).

Vanaf juli 2020 beschrijft de FCS-Free Database alternatieve media die kunnen worden gebruikt voor het kweken van 285 (januari 2023) unieke celtypen. De database wordt regelmatig bijge-



Afbeelding 2. Een celkweekplaat. (author: National Center for Advancing Translational Sciences, National Center for Advancing Translational Sciences from Bethesda, MD, Public domain, via Wikimedia Commons)

werkt en toont zowel in de handel verkrijgbare serumvrije media als mediaformuleringen uit de literatuur. Naast uitgebreide informatie over elk medium, biedt elk record ook de mogelijkheid om op elke formulering te reageren en verbeteringen voor te stellen. Bovendien kunnen gebruikers informatie over ontbrekende media rechtstreeks aan de website toevoegen, waardoor het niet alleen een informatiebron is voor, maar ook door wetenschappers.

Hoewel FCS wordt beschouwd als bijna universeel toepasbaar, zijn daarentegen chemisch-gedefinieerde media vaak celtype-specifiek, wat als consequentie heeft dat voor elk gebruikt celtype een nieuw medium moet worden ontwikkeld. Een belangrijke uitdaging bij het ontwikkelen van chemisch-gedefinieerde media als alternatief voor FCS is het enorme aantal celtypen dat wordt gebruikt - meer dan 144.000 volgens de Cellosaurus-database (Cellosaurus.org, januari 2023). Dit is ook een grote uitdaging voor de FCS-Free Database, maar we zijn erin geslaagd om dit probleem onder de aandacht te brengen en een effectieve manier te creëren voor onderzoekers om informatie over alternatieven te vinden en te delen.

Om het gebruik van FCS op korte termijn te vermijden wanneer er geen gedefinieerd medium beschikbaar is, kunnen lysaten van menselijke bloedplaatjes (zgn. human platelet lysates, hPLs) als supplement worden gebruikt, vooral bij het werken met menselijke cellen en organen. hPLs worden geproduceerd uit gedoneerd menselijk bloed dat over de bruikbaarheidsdatum heen is. Ze bevatten veel groeifactoren en lijken universeel toepasbaar te zijn. Toch zijn hPLs een biologisch product en zien we hier ook variaties tussen verschillende batches [8].

De zoektocht naar gedefinieerde media is overigens niet nieuw, het begon in 1955 toen Harry Eagle de cruciale aminozuren, vitamines, zout en glucose identificeerde die nodig zijn voor een effectieve celcultuur [9], en is sindsdien voortgezet. Het daaropvolgende wereldwijde gebruik van FCS en het relatieve succes ervan in in-vitro onderzoek heeft het onderzoek naar serumvrije alternatieven waarschijnlijk aanzienlijk vertraagd. Het is nu aan ons om het werk van Eagle af te maken en nieuwe manieren te vinden om onderzoek te doen zonder afhankelijk te zijn van FCS, en de FCS-vrije database is een belangrijk onderdeel van dit essentiële werk.

Bronnen

1. Puck TT, Ciecura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subject. *J Exp Med*. 1958;108:945-956.
2. Fisher HW, Puck TT, Sato G. Molecular growth requirements of single mammalian cells: The action of fetal-in promoting cell attachment to glass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1958;44:114.
3. Valk J van der, Moller D, Brands R, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*. 2004;18(1):11-12.
4. Gstraunthaler G, Lindl T, Valk J van der. A severe case of fraudulent bleeding of fetal bovine serum: strengthens the case for serum-free cell and tissue culture applications. *ATLA-Altern Lab Anim*. 2014;42:207-209.
5. Jochems CA, van der Valk JB, Stafleu FR, & Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *ATLA-Altern Lab Anim*. 2002; 30.2:219-227.
6. Valk J van der, Brunner D, Smet KD, et al. Optimization of chemically defined cell culture media - replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(4):1053-1063.
7. van der Valk J, Bieback K, Butz C, et al. Consensus Report Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. Published online 2017.
8. Bieback K, Fernandes-mulize B, Pati S, Schäfer R. Gaps in the knowledge of human platelet lysate as a cell culture supplement for cell therapy: a joint publication from the AABB and the International Society for Cell & Gene Therapy. *Cytotherapy*. 2019;21(9):911-924. doi:10.1016/j.jcyt.2019.06.006
9. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. 1955;122(3168):501-504.

FCS-free database

Home Events FCS-Free Database News



Afbeelding 3. Fetal Calf-Free Database (fcs-free.org).



Dit artikel is een vertaling en bewerking van een eerder op de NCRS website gepubliceerde blog: <https://ncrs.org.uk/news/change-cel-culture-exploring-alternatives-fetal-calf-serum>



De problemen rondom het gebruik van FCS zijn ook mooi uitgelogd in een filmpje van het NCad: <https://www.ncad.nl/proevenbeleid/nl/actueel/nieuws/2020/05/12/zorgvuldig-gebruik-van-foetaal-kalf-serum>



FCS-vrije database/FCS-Free Database: <https://fcs-free.org>



Cellosaurus-database: <https://www.cellosaurus.org>