

Voor koele kikkers

**Themadag
Biotechnische
Vereniging
over
Cryopreservatie
op
9 oktober 2014**

Inge Vreeswijk

Vroeg uit de veren

Als de wekker gaat om 5.45 uur vraag ik me een beetje af waarom ik me ook alweer had opgegeven voor de themadag. Maar na een gezellige autorit met lieve collega's waarmee ik kon carpoolen, was alle twijfel verdwenen. Een kop koffie met gebak later, beginnen we aan een interessante dag over cryopreservatie. De locatie van de themadag is Ouwehands Dierenpark te Rhenen. Het dierenpark staat met name bekend vanwege zijn Berenbos; een project waarbij beren die vroeger gedwongen werden om op straat te dansen, worden opgevangen om hun oude dag te kunnen slijten als beer en niet als dansmarieke. De dierentuin in Rhenen is daarnaast ook betrokken bij verschillende Europese fokprogramma's, die zijn ingesteld ter voorkoming van het uitsterven van bepaalde bedreigde diersoorten. Ten gunste van deze fokprogramma's wordt gebruik gemaakt van het cryopreserveren van onder andere sperma voor het aanleggen van een biobank.

Cryopreserveren: wat, hoe en waarom?

Cryopreservatie is een samenvoeging van cryo (koud) en preservatie (bewaren). Het is dan ook de benaming voor de techniek die het mogelijk maakt om biologisch materiaal bij zeer lage temperaturen te bewaren. Dit materiaal kan dan op een later tijdstip weer tot leven te gebracht worden. De techniek wordt gebruikt voor het invriezen van sperma, eicellen of embryo's in een vroeg stadium. Dit gebeurt zowel voor materiaal van mensen als voor materiaal van vele diersoorten zoals vissen, reptielen, koralen en zoogdieren.

Er zijn verschillende redenen waarom dierfaciliteiten cryopreserveren; het levert ruimte op voor huisvesting van (andere) dieren, het vermindert de werkdruk voor diervverzorgers, het voorkomt kans op besmetting met pathogenen, het voorkomt genetische drift binnen de kolonie, het vereenvoudigt de uitwisseling van dieren tussen instellingen zonder quarantaine noodzaak en het functioneert als een goede back up bij rampen (bijvoorbeeld brand), waarbij dieren verloren gaan.

Over muizen en olifanten

Dr. Henri Woelders is de eerste spreker van de dag. Hij is als senior scientist op het gebied van Voortplanting en Vruchtbaarheid verbonden aan de Wageningen UR Livestock Research en het Centre for Genetic Resources. Binnen het Centre for Genetic Resources in Wageningen wordt gewerkt aan het preserveren van veel verschillende diersoorten en planten. Hierdoor kunnen diersoorten die bedreigd worden met uitsterven mogelijk gered worden. Als voorbeeld wordt de Afrikaanse olifant (*Loxodonta africana*) genomen; deze olifant komt in het wild nog maar nauwelijks voor en blijkt in »



dierentuinen op natuurlijke wijze nauwelijks nakomelingen te produceren. Voor deze olifant zou cryopreservatie wel eens de redding kunnen zijn.

De themadag is met name gericht op het cryopreserveren van muizenlijnen en begint met een uitleg van de heer Woelders over de basisprincipes van cryopreservatie. De kern van zijn verhaal draait om het feit dat begrip van de fysische eigenschappen van je materiaal helpt bij het begrip van het proces van cryopreserveren. Met andere woorden, het is belangrijk dat je je realiseert dat je biologisch materiaal is opgebouwd uit verschillende stoffen, die verschillend reageren op afkoelen. Door hier rekening mee te houden, zul je een beter resultaat kunnen behalen wanneer je je materialen wilt invriezen en weer ontdooien. Zo wil je altijd voorkomen dat er intracellulaire ijskristallen ontstaan tijdens het vriesproces omdat deze schadelijk zijn. Er zijn verschillende methoden om te cryopreserveren: slowfreezing, quickfreezing en vitrificatie. De uitleg van deze methoden volgt later in dit verslag. Welke methode je kiest, is afhankelijk van wat je wilt invriezen (sperma/ eicellen of embryo's) en welke faciliteiten je tot je beschikking hebt.

Een heel keuzemenu

De methoden en protocollen voor het cryopreserveren van sperma (en ook oöcyten en ovaria) en embryo's van muizen worden uitvoerig toegelicht door Dr. Marian van Roon, die als senior scientist Transgenic Services werkzaam is bij InnoSer NL. Ze neemt ons mee langs de verschillen tussen het invriezen van sperma en embryo's en langs de kritische factoren in het opzetten van een preservatie-protocol. Het invriezen van embryo's is net als het invriezen van sperma betrouwbaar en kan voor een snelle recovery van een kolonie zorgen. Echter, kan je met het invriezen van sperma maar één van de twee allelen preserveren, terwijl je met het invriezen van embryo's alle allelen preserveert. Bovendien geldt voor het invriezen van embryo's dat de werkdruk aan het begin van het proces ligt (de fok moet worden opgehoogd om voldoende embryodonoren en embryo's te verkrijgen bijvoorbeeld), terwijl bij het invriezen van sperma/oöcyten/ovaria de werkdruk aan het einde van het proces ligt (na ontdooien zal een In Vitro Fertilisatie moeten plaatsvinden). De keuze voor het invriezen van embryo's ten opzichte van sperma/oöcyten/ovaria is dan ook mede afhankelijk van de wens om een lijn te ontdooien op termijn.

Zoals ook door de heer Woelders is aangestipt zijn er verschillende methoden om embryo's te cryopreserveren. Mevrouw van Roon legt de verschillen uit tussen de technieken:

Slowfreezing

De naam van de methode zegt het al: langzaam invriezen. Bij slowfreezing wordt de temperatuur verlaagd met een snelheid tussen de 0.2 en 1.0°C per minuut. De embryo's worden beschermd door een cryoprotectant. Een cryoprotectant beschermt de embryo's tegen kristalvorming en bij een optimale vriessnelheid zullen ze zonder beschadiging invriezen.

Quickfreezing

Ook deze naam is duidelijk: het snel invriezen van de embryo's. Hiervoor is een ander cryoprotectant nodig en tien minuten na toevoegen van het protectant kunnen de embryo's rechtstreeks in de vloeibare stikstof gedompeld worden.

Vitrificatie

Dit is een methode waarbij de embryo's worden ingevroren in een cryoprotectant dat bij lage temperaturen een glasachtige substantie wordt. Hierdoor wordt voorkomen dat er intracellulair ijskristallen kunnen ontstaan. Ook hiervoor geldt dat je de methode kiest die past binnen de mogelijkheden van je faciliteit met betrekking tot personeel en apparatuur.

Het invriezen van sperma en oocyten gebeurt al succesvol sinds 1990. Het invriezen van muissperma is niet zo makkelijk als het invriezen van sperma van bijvoorbeeld de mens, omdat de vorm van de spermatozoa ietwat afwijkt. De succesfactor is hierdoor zelfs afhankelijk van de muizenstam. De groep van professor Naomi Nakagata van Kumamoto University in Japan heeft veel onderzoek gedaan naar het invriezen van sperma en heeft een zeer succesvol protocol ontwikkeld. Dit protocol, dat op brede schaal wordt toegepast, wordt door mevrouw van Roon volledig toegelicht en is te vinden op de website van CARD: <http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/english/sigen/>

Een leuke afsluiting

Na deze interessante praatjes en met onze hoofden vol met informatie hebben we de middag afgesloten met een rondleiding door Ouwehands Dierenpark. Onze gids had zich goed voorbereid en wist ons van bijna alle dieren uit de doeken te doen hoe de hersenen zijn opgebouwd en hoe slim de dieren wel (of juist niet) zijn. Vele foto's en dieren verder, hebben we de dag afgesloten met een hapje en een drankje en zijn we voldaan weer naar het hoge noorden vertrokken.

Bij deze wil ik de organisatie van de themadag en iedereen die hieraan heeft meegewerkt hartelijk bedanken voor een geslaagde dag! En nu maar kijken of we door deze dag voor koele kikkers, 'koele muizen' kunnen maken.

Inge Vreeswijk, UMC Groningen

De Afrikaanse olifant komt in het wild nog nauwelijks voor. Hier een in Ouwehands Dierenpark.

