

Studierapport 14c

Ontwikkelingen in het moleculair en celbiologisch
onderzoek ten behoeve van de dierlijke produktie

Nationale Raad
voor Landbouwkundig
Onderzoek
's-Gravenhage, 1983

De serie studierapporten beoogt de resultaten van studies die op verzoek of in het kader van de Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek worden uitgevoerd, ruimere bekendheid te geven.

De serie wordt uitgegeven onder verantwoordelijkheid van de secretaris van de NRLO. Voorzover de verantwoordelijkheid voor de inhoud van een publikatie niet blijkt uit de titelpagina en/of het voorwoord, wordt hierover nadere informatie verstrekt.

Uitgave en copyright:
Nationale Raad voor
Landbouwkundig Onderzoek

Postbus 297,
2501 BD 's-Gravenhage

INHOUDSOPGAVE

	Blz.
DEEL 1: EEN BELEIDSMATIGE VERKENNING Dr. J.J. Dekkers en Prof.Dr. C.C. Oosterlee (Landbouw- hogeschool Wageningen)	
1. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	1
2. INLEIDING	3
3. VERKENNING VAN HET TERREIN	5
3.1. Wetenschappelijke ontwikkelingen	5
3.1.1. Fokkerij	5
3.1.1.1. Bestaande technieken	5
3.1.1.2. Mogelijk belangrijke terreinen	7
3.1.2. Dierlijke cellen	10
3.1.3. Bacteriën en virussen	12
3.2. Enige beschouwingen ten aanzien van de veiligheids- aspecten	13
4. ENKELE BELEIDSOVERWEGINGEN	15
Bijlage: Samenstelling Begeleidingscommissie	19
DEEL 2: LEZINGEN, GEHOUDEN TIJDENS DE STUDIEDAG VAN DE NRLO- CONTACTCOMMISSIE 'BIOCHEMISCHE-FYSIOLOGISCHE TECHNIEKEN IN DE DIERLIJKE PRODUKTIE' d.d. 14 mei 1982	21
1. TOEPASSING VAN CELBIOLOGISCHE TECHNIEKEN IN DE DIER- LIJKE PRODUKTIE, Dr.Ir. S.H.M. Metz, Instituut voor Veevoedingsonderzoek (IVVO), Lelystad	23
2. TOEPASSING VAN EMBRYO-TECHNIEKEN IN DE VETERINAIRE RESEARCH, Prof.Dr. G.H. Zeilmaker, Erasmus Universiteit, Rotterdam	25
3. DE PRAKTISCHE TOEPASSING VAN EMBRYO-TRANSPLANTATIE (E.T.) BIJ HET RUND, Drs. H. Hoogenkamp, Vakgroep Verloskunde, K.I. en Voortplanting, Fakulteit der Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit Utrecht	31
4. MOGELIJKE TOEPASSINGEN VAN CLONERINGSTECHNIEKEN IN DE DIERLIJKE PRODUKTIE, Dr. D.F.M. van de Wiel, Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek 'Schoonoord', Zeist	37
DISCUSSIE 'BLOK' 1	43

		Blz.
5.	DE BETEKENIS VAN SOMATISCHE CELHYBRIDISATIE VOOR DE DIERLIJKE PRODUKTIE. MONOCLONALE ANTILICHAMEN: EEN BELANGRIJKE ONTWIKKELING IN DE SEROLOGIE, Dr. E. Egberts, Vakgroep Experimentele Diermorphologie en Celbiologie, Landbouwhogeschool, Wageningen	49
6.	TOEPASSING VAN HYBRIDOMA'S ALS BRON VAN MONOCLONALE ANTILICHAMEN IN DE DIERLIJKE PRODUKTIESFEER, Ir. P. Booman, Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek 'Schoonoord', Zeist	59
	DISCUSSIE 'BLOK' 2	65
7.	TOXICITEITSONDERZOEK MET BEHULP VAN CELKWEEKSYSTEMEN, Dr. G.M. Alink, Vakgroep Toxicologie, Landbouwhogeschool, Wageningen	71
8.	MANIPULATIE VAN DE PENSFERMENTATIE DOOR EXOGENE STOFFEN, Dr. A. de Jong, Instituut voor Chemotherapie, Bayer A.G., Wuppertal, BRD	81
9.	HET GEBRUIK VAN <u>IN VITRO</u> TECHNIEKEN VOOR HET VASTSTELLEN VAN NEVENEFFECTEN VAN ANTIBIOTICA OP HET IMMUUNSYSTEEM, Dr. J.L. Grondel, Dr. E. Egberts en Dr. W.B. van Muis- winkel, Vakgroepen Experimentele Diermorphologie/Cel- biologie en Veehouderij, Landbouwhogeschool, Wageningen	89
	DISCUSSIE 'BLOK' 3	95

DEEL 1

EEN BELEIDSMATIGE VERKENNING

Dr. J.J. Dekkers en Prof.Dr. C.C. Oosterlee,
Landbouwhogeschool, Wageningen

1. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

1. Dit rapport bevat een beleidsmatige verkenning van een aantal te verwachten ontwikkelingen in het moleculair en celbiologisch onderzoek ten behoeve van de dierlijke produktie. Het dient gezien te worden als aanvulling op de NRLO-probleemstudies 'Genetische manipulatie in dienst van de landbouw' en 'Commerciële aspecten van plantenbiotechnologisch onderzoek'.

2. Onderscheid wordt gemaakt in ontwikkelingen op het terrein van de fokkerij, van de dierlijke cellen en van de biotechnologische produktie van biologisch actieve verbindingen met behulp van gerecombineerde celsystemen. Geconcludeerd wordt dat bij de fokkerij vooral onderzoek naar het beïnvloeden van het geslacht van het embryo en van de vroeg-embryonale sterfte naast onderzoek naar factoren die de ziekteresistentie van landbouwhuisdieren bepalen (inclusief de studie van het Major Histocompatibility Complex) in het landbouwkundig onderzoek versterking behoeven.

3. Wat betreft de benodigde infrastructuur is het noodzakelijk om uitvoering te geven aan de reeds eerder^{*)} naar voren gebrachte gedachte om een service-laboratorium voor de produktie van hybridoma's ten behoeve van het landbouwkundig onderzoek op te richten. Er dient op korte termijn een (kleine) commissie van belanghebbenden te worden ingesteld om te adviseren over locatie en de benodigde investeringen.

Een aspect dat in dit verband tevens aandacht zou behoeven, is het conserveren van (hybride)cellijnen in het landbouwkundig onderzoek. Hierbij dient men attent te zijn op mogelijkheden tot internationale samenwerking.

4. Enige beschouwingen worden naar voren gebracht ten aanzien van de in het geding zijnde ethische en veiligheidsaspecten. Geconcludeerd wordt dat de ethische problemen bij de dierlijke produktie minder urgent lijken dan in de humane sector.

*) Biotechnologie in het landbouwkundig onderzoek, Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek, Studierapport nr. 9.

Wat betreft de veiligheidsaspecten kan worden gesteld dat deze aanzienlijk minder problematisch zijn dan het zich enige jaren geleden liet aanzien. Het volgen van en het toezien op uitvoering van de richtlijnen, opgesteld door de Commissie ad hoc Recombinant-DNA-werkzaamheden, lijkt voldoende.

2. INLEIDING

In het kader van de bespreking van de rapporten 'Genetische manipulatie in dienst van de landbouw' en 'Commerciële aspecten van plantenbiotechnologisch onderzoek' in de Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek kwam naar voren dat het gewenst is meer aandacht te besteden aan de consequenties van de nieuwe ontwikkelingen op het terrein van de celbiologie en van de moleculaire biologie voor het onderzoek ten behoeve van de dierlijke produktie. Besloten werd hier in een vervolg-rapport op in te gaan en de beide auteurs werden bereid gevonden deze taak op zich te nemen. Zij konden hiervoor kennis nemen van de lezingen, gehouden tijdens een studiedag van de NRLO-Contactcommissie 'Biochemische-fysiologische technieken in de dierlijke produktie' op 14 mei 1982. Deze lezingen zijn als deel 2 in deze studie te vinden. Tevens werd aan een aantal deskundigen in de dierlijke produktiesfeer verzocht hun visie op het terrein te geven waarbij zij als een begeleidingscommissie hebben gefunctioneerd. Hun namen zijn vermeld in de bijlage.

Het rapport is als volgt opgebouwd. Eerst wordt een verkenning gepresenteerd, gezien vanuit de wetenschappelijke stand van zaken. Benadrukt zij dat deze verkenning slechts het terrein in vogelvlucht weergeeft, waarbij bewust is nagelaten grondige wetenschappelijke beschouwingen aan de orde te stellen. Drie gebieden worden onderscheiden, te weten: 1. technieken gericht op de fokkerij, 2. dierlijke cellen en 3. biotechnologische produktie van biologisch actieve polypeptiden met behulp van voor dit doel gerecombineerde bacteriën. Daarnaast zal summier enige aandacht worden besteed aan de ethische en veiligheidsaspecten die bij het besproken onderzoek in het geding zijn.

Het geheel wordt besloten met een aantal beleidsoverwegingen waarin de perspectieven (aandachtspunten) en de te overwegen beleidsmaatregelen naar voren zullen worden gebracht.

3. VERKENNING VAN HET TERREIN

3.1. Wetenschappelijke ontwikkelingen

In dit hoofdstuk zal worden ingegaan op een aantal wetenschappelijke ontwikkelingen op het terrein van de moleculaire en de celbiologie die van belang zijn of kunnen worden voor de dierlijke produktie. Allereerst zal aandacht worden besteed aan de fokkerij. Daarna zullen enkele ontwikkelingen op het gebied van het onderzoek met dierlijke cellen en met bacteriën en virussen, voorzover van belang voor de dierlijke produktiesector, worden belicht.

3.1.1. Fokkerij

Reeds eeuwenlang worden landbouwhuisdieren gefokt met als voornaamste doel, door een betere combinatie van genen, de nutseigenschappen te optimaliseren. Door middel van selectie op economisch belangrijke eigenschappen is men er in geslaagd dieren te verkrijgen waarmee een hoger rendement en een produkt met een lagere kostprijs gerealiseerd konden worden. Door de toename in de biologische kennis en de introductie van nieuwe technieken is, vooral na de tweede wereldoorlog, de efficiëntie van de reproductie verhoogd. Met de introductie van de kunstmatige inseminatie kan in het kader van de dierlijke produktie in zekere zin over biotechnologie worden gesproken. De ingrepen bij het vrouwelijk dier, zoals oestrus synchronisatie en embryotransplantatie, zijn van meer recente datum. Het is niet ondenkbaar dat op dit terrein, op grond van nieuwe inzichten en technieken, nog vooruitgang geboekt kan worden. In het volgende zal dit kort worden besproken. Daarna zal worden ingegaan op een aantal biologische technieken met geslachtscellen, die zich voorts nog in de researchfase bevinden en waarvan op dit moment nog geen directe toepassing te verwachten valt. Het zal nog veel (basis)onderzoek vereisen voordat deze technieken voor de praktijk van de dierlijke produktie van belang zullen kunnen worden. Het landbouwkundig onderzoek zal in dezen uiteraard wel attent moeten zijn.

3.1.1.1. Bestaande technieken

a. Kunstmatige inseminatie

De kunstmatige inseminatie (K.I.) heeft vooral in de rundveehouderij een grote vlucht genomen, alhoewel de K.I. in principe bij alle landbouwhuis-

dieren kan worden toegepast. Oorspronkelijk is de K.I. vooral van betekenis geweest voor het voorkomen van dekinfecties. Nu staan de foktechnische voordelen centraal en de genetische vooruitgang in produktieaanleg is daardoor per generatie sneller geworden.

b. Conserveren van sperma

De grote vlucht die de K.I. heeft genomen is te danken aan het invoeren van technieken waarbij het sperma bij zeer lage temperaturen bewaard kan worden. Opgemerkt zij dat dit vooral geldt voor stieresperma; voor diverse andere diersoorten is de lange-termijn-conservering van sperma nog niet goed mogelijk of verre van optimaal (sterk verminderd bevruchtend vermogen).

Op het terrein van de opslag van stieresperma zijn, afgezien van voortdurende verbeteringen van invriesprotocols, geen spectaculaire veranderingen te verwachten. In hoeverre het systeem van wachtstieren vervangen wordt door sperma-opslag is eerder van de kostprijs dan van technische ontwikkelingen afhankelijk.

c. Oestrus synchronisatie

Synchronisatie van de oestruscyclus, om een kudde na hormoonbehandeling in dezelfde periode te laten dekken of insemineren, is technisch mogelijk. Voor de praktijk van de veehouderij is het waarschijnlijk vooral voor de schapen- en varkenshouderij in voldoende mate interessant.

d. Embryotransplantatie

De afgelopen jaren zijn technieken ontwikkeld om embryo's van het ene naar het andere dier over te brengen. Het is mogelijk aan de techniek een superovulatie van de donor te laten voorafgaan. Bij een superovulatie is het ovarium hormonaal gestimuleerd, waardoor het aantal vrijkomende eicellen vergroot wordt. Opgemerkt zij dat het theoretisch goed mogelijk is hormonale sturing van follikel-rijping niet alleen in relatie met superovulatie te zien, maar ook in het licht van de kwaliteit van de eicel en van de embryonale sterfte. Dit temeer daar de omvang van de embryonale sterfte zowel bij varkens als bij rundvee aanzienlijk is (circa 30%). Fundamenteel-praktisch onderzoek naar het verminderen van de variatie in worpgrootte bij varkens en stabilisatie van tussenkalftijden bij rundvee is van groot economisch belang.

Embryotransplantatie krijgt in toenemende mate betekenis voor de rundveefokkerij. Het nakomelingschap van koeien met een hoge produktie-aanleg kan worden opgevoerd door de receptorkoeien de getransplanteerde embryo te laten voldragen. Nationaal is de genetische vooruitgang van een populatie sneller via de mannelijke lijn te verkrijgen. Voor de individuele fokker kan de embryotransplantatie van betekenis zijn. Deze betekenis kan in de toekomst aanzienlijk groter worden indien het mogelijk wordt door middel van een chromosoom-analyse van het trophoblast de sekse te bepalen.

Op incidentele schaal kan embryotransplantatie toegepast worden in gevallen waarbij veterinaire-hygiënische maatregelen export van levende dieren onmogelijk maakt. Tevens kan het kostenelement bij export over grote afstanden een rol spelen.

3.1.1.2. Mogelijk belangrijke terreinen

a. Bepalen van de sekse

De mogelijkheid om de sekse van een embryo te bepalen en om X- en Y-dragend spermatozoön te scheiden zal belangrijke consequenties hebben voor de dierlijke produktie met betrekking tot het verbeteren van de selectie-intensiteit en het vergroten van de vleesproduktie. Doelstelling bij het onderzoek is om te komen tot een methode die eenvoudig, snel, goedkoop, betrouwbaar en niet schadelijk is. De meest betrouwbare methode tot nu toe bij embryo's is karyotypering. Een alternatieve methode zou kunnen liggen in de mogelijkheid van het aantonen van het HY-antigen op het mannelijk embryo met behulp van gelabelde monoclonale antilichamen tegen dit HY-antigen.

Een betrouwbare techniek om X- en Y-dragend spermatozoön te scheiden is nog niet voorhanden. Sommigen menen dat de hybridomatechniek (zie paragraaf 3.1.2.) aanknopingspunten in dit opzicht biedt. Anderen zien meer mogelijkheden met een flow-cytofluorometer (cell-sorter) indien de ongebruikelijke celvorm van het spermatozoön (met staart) geen belemmering zal blijken te zijn. De mogelijkheid van scheiding ligt dan in karakteristieke X- en/of Y-chromosoom-DNA-sequenties die fluorescentie vertonen met een celwand-penetrabel niet-mutageen en reversibel bindend fluorochroom.

b. Erfelijk bepaald zijn van de weerstand

Alhoewel de weerstand tegen ziektes, waarbij vooral wordt gedoeld op infectieziektes, als een secundair produktiekenmerk kan worden opgevat en de verbetering deels via de traditionele selectiemethoden zou kunnen worden benaderd, lijkt het gewenst het erfelijk bepaald zijn van de weerstand hier apart te bespreken. Een belangrijk argument hiervoor is, dat ingrepen in de weerstand tegen ziektes de entiteit als organisme van het dier weleens dusdanig kunnen beïnvloeden dat van genetische manipulatie in de ruime betekenis kan worden gesproken. Een tweede argument is gelegen in de grote betekenis van de ziekte voor het rendement van het veebedrijf.

De weerstand tegen ziektes heeft zowel kwalitatief als kwantitatief genetische aspecten welke vooral via laboratoriumtechnieken zichtbaar worden gemaakt. Dit nieuwe terrein van onderzoek vraagt om een fundamentele benadering van een aantal basisvragen. Een van deze vragen is bijvoorbeeld of het mogelijk is een aantal parameters van de afweer zoals van de a-specifieke afweer, van het immuunsysteem en van het Major Histocompatibility Complex (MHC), te combineren tot één index voor de algemene weerstand.

Door onderzoek bij mens en muis zijn vooral over het Major Histocompatibility Complex gegevens beschikbaar gekomen. Met behulp van immunologische technieken kunnen specifieke combinaties van MHC-allelen worden bepaald. Sommigen hiervan zijn aanwijsbaar gekoppeld aan de zogenoemde specifieke weerstand (gericht tegen één bepaalde ziekte van een populatie). Het is bekend dat alle landbouwhuisdieren ook een MHC bezitten. Kennis hiervan zou benut moeten worden voor onderzoek naar het verband met gevoeligheid voor specifieke ziektes. Tenslotte zij opgemerkt dat verbetering van de weerstand door middel van selectie ook van grote betekenis kan zijn voor de vaccinatieprogramma's. Op grond van recent onderzoek kan worden verwacht dat hierdoor op populatieniveau een betere bescherming wordt bereikt.

c. Bevruchting in vitro

Bevruchting in vitro gevolgd door een geslaagde zwangerschap is tot nu toe bij een aantal soorten gelukt, zoals konijn, muis, rat, en de mens. Voor landbouwhuisdieren is het echter nog niet gelukt dit op een consistente en herhaalbare manier te realiseren. Tot nu toe heeft het in vitro-

werk vrijwel uitsluitend gediend om de celbiologische en biochemische processen, die zich bij de bevruchting afspelen, beter te begrijpen. Voor praktische toepassingen is de techniek nog te weinig ver gevorderd. De verwachting is echter dat dit de komende één à twee decaden wel het geval zal zijn. Het is noodzakelijk dat het landbouwkundig onderzoek op deze ontwikkelingen attent is, met name in relatie tot de mogelijkheid om de sekse van het embryo te bepalen.

d. Kerntransplantatie en clonering

Door bij de muis kernen te isoleren uit cellen van kiemcellagen in een vroeg differentiatiestadium en deze over te brengen in geënculeerde pas bevruchte eicellen is het in principe mogelijk om genetisch identieke individuen te verkrijgen. Het is echter de vraag of deze techniek voor de dierlijke produktie van enig belang zal worden. Mogelijk zal de tweelingdracht bij runderen wel toepassingsmogelijkheden kunnen hebben in de vee-teelt waarbij het geslacht van de embryo's wel bekend moet zijn, in verband met het voorkomen van freemartinism (het optreden van steriele vrouwelijke kalveren).

e. Recombinant-DNA-onderzoek

Door extra kopieën van een gen in de pronuclei, die vlak na de bevruchting ontstaan, in te spuiten, is het in principe mogelijk 'vreemde' genetische informatie in te brengen. Ofschoon enkele experimenten bij muizen technisch geslaagd lijken, zijn op dit terrein bij landbouwhuisdieren binnen afzienbare tijd geen voor de praktijk toepasbare ontwikkelingen te verwachten. Dit geldt ook ten aanzien van het gebruik van oncogene (tumor-verwekkende) virussen om 'vreemde' genen te integreren in dierlijk DNA. Voordat deze genen gericht kunnen worden ingebracht, moet de dierlijke cel eerst geïdentificeerd worden en de locatie op de chromosomen in kaart worden gebracht (gen-mapping). Het onderzoek hiernaar is kortgeleden gestart en zeer snelle vorderingen liggen niet in de lijn der verwachting. Daarnaast lijkt het in de rede te liggen om aan te nemen dat economisch belangrijke eigenschappen niet op één gen gelocaliseerd zullen zijn, hetgeen de toepasbaarheid van recombinant-DNA-onderzoek aanzienlijk vermindert.

Als zeer recente ontwikkeling kan worden gemeld dat onderzoekingen op het terrein van genoverdracht tussen zoogdiersoorten - die aanvankelijk

weinig succesvol waren - in een versnelling zijn geraakt door de geslaagde transplantatie van het groeihormoon-gen van de rat naar de muis. De overdracht tussen deze twee soorten leidt tot reuzengroei bij de muis (1,5 à 2 keer het gewicht in dezelfde tijd). Niet zeker is of de expressie van het getransplanteerde gen na overdracht in volgende generaties stabiel is. Het verdient aanbeveling de verdere ontwikkelingen, die op dit terrein bij landbouwhuisdieren zeker zullen volgen, nauwlettend in de gaten te houden.

3.1.2. Dierlijke cellen

Naar de technieken van celfusie en cloneren, die in de vorige paragraaf gedeeltelijk aan de orde zijn geweest, wordt al bijna twee decaden (basis)onderzoek verricht. Vooral de laatste jaren vertoont het aantal wetenschappelijke publikaties op deze terreinen van onderzoek een aanzienlijke stijging, hetgeen als een indicatie kan worden gezien voor de groeiende belangstelling voor deze takken van biologisch onderzoek. Een andere gerelateerde basistechniek is de dierlijke cel- en weefselkweek. Deze techniek gaat terug tot het begin van deze eeuw, toen het gelukte om organen, buiten het organisme, op kunstmatige wijze in leven te houden. Sindsdien is het onderzoek naar cel- en weefselkweek aanzienlijk toegenomen en heeft toepassing plaatsgevonden op velerlei terreinen. Genoemd kunnen worden het kankeronderzoek en bacteriologisch, virologisch en farmacologisch onderzoek. Tevens vindt in toenemende mate toepassing plaats op het terrein van de toxicologie (toxiciteitstests) met als belangrijk voordeel het terugdringen van het gebruik van proefdieren ten behoeve van deze tests.

Een van belang zijnde toepassing betreft verder de produktie in vitro van biologisch actieve verbindingen zoals virale vaccins en farmacologisch werkzame stoffen. De laatste jaren blijkt het ook mogelijk deze stoffen biotechnologisch te produceren door gebruik te maken van voor dit doel gerecombineerde bacteriën. Op beide methoden zal in de volgende paragraaf nader worden ingegaan.

Een doorbraak in de produktie van biologisch belangrijke stoffen betreft de hybridoma's. In 1975 slaagden Köhler en Milstein er in een techniek te ontwikkelen om lymfocyten uit de milt van muizen - die van te voren ingespoten zijn met een bepaald antigeen - te fuseren met muizen-myelomacellen. De op deze manier verkregen hybride-myelomacellen, of hybridoma-

cellen, vertonen zowel de specifieke antilichaam-produktie van de lymfocyte-cel als het onbeperkt prolifererende (tumor) karakter van de myeloma-cellen. Op deze manier was het voor de eerste keer mogelijk monoclonale antilichamen, dat is een antilichaam geproduceerd door een kloon van één celsoort, te verkrijgen met een zeer hoge specificiteit (dus geen mengsel van antilichamen, zoals bij de traditionele bereiding van antilichamen vaak het geval is). De hybridomatechniek heeft, vooral in de medische sector, al tot vele toepassingen geleid, in het bijzonder op het terrein van:

- de immunodiagnostiek; monoclonale antilichamen, gelabeld met een radio-isotoop (RIA) of enzymen (ELISA), kunnen worden gebruikt om antigenen te detecteren die gepaard gaan met een bepaalde ziekte (bijvoorbeeld leukemie of hepatitis) en zo een specifieke fysieke conditie diagnosticeren;
- het zuiveren van waardevolle verbindingen uit mengsels met behulp van immuno-affiniteitschromatografie zoals bijvoorbeeld gelukt is bij interferon;
- het typeren van weefsels voor transplantatie en voor het detecteren van gevoeligheid tegen ziektes;
- het in vivo onschadelijk maken van pathologische cellen met behulp van celspecifieke monoclonale antilichamen gekoppeld met toxines.

Tevens zijn belangrijke toepassingen te verwachten in de landbouw zowel in de plantaardige als in de dierlijke produktie, bijvoorbeeld bij het determineren van virussen, bacteriën, protozoën en parasieten, als hulp-gereedschap bij problemen in het biologisch basisonderzoek, bij het gebruik in de genetische analyse (bijvoorbeeld bij het onderzoek naar de structuur van het Major Histocompatibility Complex), bij het in kaart brengen van functionele plaatsen op moleculen en het bepalen van de eiwitsequenties die verantwoordelijk zijn voor de infectiviteit van virussen, bij het opsporen van residuen en andere verontreinigingen in dierlijke produkten (kwaliteitsbewaking) en bij het onderzoek naar de werking van hormonen ten behoeve van de studie van het mechanisme van hormonale evenwichten.

Het grote potentiële belang van de hybridomatechniek voor het landbouwkundig onderzoek zij hiermee voldoende aangetoond.

Het lijkt derhalve zeer gewenst toepassingen van deze techniek als te stimuleren aandachtspunt in het Nederlands landbouwkundig onderzoek te nemen.

3.1.3. Bacteriën en virussen

Door, via de recombinant-DNA-techniek, in een bacterie het gen in te brengen dat codeert voor een immunogeen actief polypeptide en vervolgens dit gen tot expressie te brengen, bestaat de mogelijkheid via microbiële fermentatie antigenen te produceren ten behoeve van de vaccinbereiding tegen infectueuze ziektes. Een andere mogelijkheid betreft het langs deze weg produceren van polypeptide-hormonen. Deze methode is in het bijzonder aantrekkelijk als het via de weefselkweekmethode niet of niet eenvoudig is om deze polypeptides te verkrijgen. Extractie uit organen is vrijwel altijd duur en levert vaak slechts uiterst geringe hoeveelheden. Daarnaast gelden als voordelen van de recombinant-DNA-methode ten opzichte van weefselkweek, dat geen grote hoeveelheid infectueus virulent virus behoeft te worden geproduceerd en dat de opbrengst aan biomassa per eenheid volume en per tijdseenheid verscheidene malen groter is. Hier staat echter tegenover dat bacteriële systemen tot nog toe niet in staat zijn gebleken eiwitten te glycosyleren - d.w.z. van koolhydraatzijketens te voorzien -, hetgeen de immunogene activiteit nadelig kan beïnvloeden (een mogelijkheid om dit probleem te omzeilen is over te stappen op eukaryote gastheer-vector systemen). Tevens zijn er aanwijzingen dat de produktie van een aantal stoffen in bacteriële cellen wordt beperkt omdat deze toxisch zouden zijn voor de cellen die ze produceren. Al met al ziet het er naar uit dat beide produktiemethoden in de toekomst naast elkaar zullen bestaan, waarbij - afhankelijk van diverse factoren - in een aantal gevallen de voorkeur zal worden gegeven aan de weefselkweekmethode en in een aantal andere gevallen aan de recombinant-DNA-techniek. Met redelijke mate van zekerheid kan worden gesteld dat dit voor de eerste de produktie van levende virale vaccins zal zijn en voor de laatste de produktie van polypeptide-hormonen. Wat betreft gedode virale antigenen is het vaak niet eenvoudig te voorspellen welke methode het aantrekkelijkst zal blijken. Dit geldt bijvoorbeeld de produktie van antigen(en) tegen monden- en klauwzeervirus. Het lijkt derhalve noodzakelijk dat in Nederland, naast onderzoek aan dierlijke cel- en weefselkweek, voldoende aandacht wordt besteed aan recombinant-DNA-onderzoek ten behoeve van de veterinaire gezondheidszorg. Opgemerkt zij dat hier uiteraard ook een belangrijke taak ligt voor de industriële producenten van veterinaire vaccins.

Een aspect dat in dit rapport zeker niet mag ontbreken is de te verwachten invloed van de recombinant-DNA-techniek op het veevoedingsonder-

zoek. Momenteel wordt, met name in het buitenland, gewerkt aan het ontwikkelen van toevoegmiddelen die het ensilerings(inkuil)proces verbeteren. Het gaat hierbij om toevoegmiddelen in de vorm van geschikte bacteriemengsels en in de vorm van enzymen die suikers vrijmaken. Onderzoek naar een dergelijke conservering van ruwvoeders, geënt op het gebruik van micro-organismen die al dan niet genetisch gemodificeerd zijn, dient als perspectiefrijk te worden gezien. Tevens zij in dit verband gewezen op het toenemende belang van de biotechnologische produktie van stoffen die als veevoeder of als veevoederadditief kunnen dienen.

3.2. Enige beschouwingen ten aanzien van de veiligheidsaspecten

De laatste jaren kan een groeiende bezorgdheid worden geconstateerd ten aanzien van de ethische en veiligheidsaspecten van het moleculair en celbiologisch onderzoek. Het is niet de bedoeling van de auteurs dit aspect hier grondig te behandelen. Verwezen zij naar het intussen grote aantal publikaties dat hierover is verschenen. Volstaan wordt met het plaatsen van enige kanttekeningen.

Wat betreft de veiligheidsaspecten van recombinant-DNA-onderzoek is gebleken dat de enkele jaren geleden - ook door wetenschappers - naar voren gebrachte zorg in de praktijk niet gegrond is gebleken. Gesteld kan worden dat in geval de richtlijnen worden aangehouden, die door de landelijke commissie ad hoc recombinant-DNA-onderzoek zijn opgesteld, het gevaar van eventueel ongewenste gebeurtenissen vrijwel afwezig is. Op te merken valt dat in internationaal verband ontwikkelingen gaande zijn om de richtlijnen en beperkingen te versoepelen. Een aspect dat voor het landbouwkundig onderzoek van belang kan worden is de verbetering van micro-organismen die symbiontisch werken zoals de pensflora. Het economisch belang hiervan is evident maar de vraag lijkt gewettigd of de toelaatbare veiligheidsgrenzen hiermee niet worden overschreden.

Op het terrein van de ethische aspecten van de resultaten en toepassingen van moderne celbiologische technieken lijkt minder voortgang te zijn geboekt. Vooral de bevruchting in vitro en de mogelijkheid van het verkrijgen van identieke nakomelingen (clonen) verdienen overdenking in dit opzicht.

Voorshands zijn de auteurs geneigd de urgentie hiervan vooral bij humane toepassingen te zien. Uiteraard ontslaat dit het landbouwkundig onderzoek er niet van bijdragen te leveren.

4. ENKELE BELEIDSOVERWEGINGEN

Teneinde te beoordelen welke van de in het voorgaande hoofdstuk besproken onderwerpen op korte termijn stimulering behoeven, verdient het aanbeveling criteria te formuleren die hierbij behulpzaam kunnen zijn. Zo kunnen vooral ontwikkelingen, waarvan mag worden verwacht dat ze binnen afzienbare termijn gereed zullen zijn voor toepassing en grote praktische consequenties zullen hebben, reden zijn voor een intensievere aanpak. Des te meer verdient dit overweging als een goede aansluiting en/of uitbreiding kan worden gevonden bij bestaande activiteiten. Ook het feit dat de ontwikkelingen op een bepaald terrein van onderzoek snel gaan, kan aanleiding zijn op zijn minst expertise in het landbouwkundig onderzoek op te bouwen c.q. uit te bouwen. Tenslotte kan als belangrijke overweging gelden de voornemens in de NRLO-Meerjarenvisie 1982 - 1986, waarin bij de NRLO-partners wordt gepleit voor extra aandacht voor de biotechnologie, de genetische manipulatie, de immunologie, de bodembioecologie en de oecologie.

De volgende onderzoeksterreinen^{*)} worden, uitgaande van deze overwegingen, door de auteurs en door de leden van de begeleidingscommissie als kansrijk gezien voor het Nederlands landbouwkundig onderzoek:

1. Onderzoek naar het bepalen van de sekse.

De consequenties van dit onderzoek zijn aanzienlijk. Aangenomen mag worden dat binnen afzienbare termijn belangrijke resultaten te verwachten zijn. Onderzoek wordt geëntameerd naar de mogelijkheid om met behulp van monoclonale antilichamen runderembryo's vóór transplantatie in geslacht van elkaar te onderscheiden. Mogelijkheden tot scheiding die aangrijpen op specifieke verschillen in DNA-sequentie op het X- en Y-dragend chromosoom zijn alleen nog theoretisch te funderen. De flow-cytofluorometer op het ITAL kan bij dit type onderzoek grote diensten bewijzen. Het ligt voor de hand de verdere uitwerking vooral toe te vertrouwen aan het Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek en aan de Fakulteit der Diergeneeskunde. Het lijkt zeer gewenst dat de Coördinatiecommissie Voortplantingsonderzoek een studiegroepje instelt om met voorstellen te komen ten aanzien van werkplan en taakverdeling.

^{*)} Weergegeven in willekeurige volgorde.

2. Onderzoek naar de vroeg-embryonale sterfte bij landbouwhuisdieren.

Onderzoek naar de kwaliteit van de te ovuleren eicel kan belangrijk inzicht verschaffen in de aard van de vroeg-embryonale sterfte bij landbouwhuisdieren. Beheersing hiervan heeft grote consequenties voor de dierlijke produktie. Het verdient aanbeveling om de werkzaamheden van de nieuw gevormde LH-werkgroep, die er op gericht is om de mogelijkheden van de vruchtbaarheidsbeheersing in de vroege dracht te bestuderen, te volgen en van de benodigde personele en materiële steun te voorzien. Tevens zij gewezen op de activiteiten die op het Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek in dit kader plaatsvinden, zoals onderzoek omtrent het niet of niet tijdig bronsig worden (anafrodisie) en omtrent peri- en post-natale sterfte en het onderzoek aan de Fakulteit der Diergeneeskunde naar in vitro kweek en ovulatie van follikels bij de koe. Voorgesteld wordt dat de Coördinatiecommissie Voortplantingsonderzoek de benodigde aanpak in een werkplan vastlegt.

3. Onderzoek naar de factoren die de ziekteresistentie bij landbouwhuisdieren bepalen.

De grote consequenties van dit onderzoek, dat ligt op het terrein van de immunologie, zijn evident. Onderzoek vindt reeds plaats bij de Fakulteit der Diergeneeskunde, het Centraal Diergeneeskundig Instituut en de Landbouwhogeschool. Bestudering van het MHC dient in het landbouwkundig onderzoek een belangrijk aandachtsgebied te zijn waarbij onderzoek bij de kip, onder meer gezien de structuur van de bedrijfstak, zeer waarschijnlijk het meest perspectief biedt. Ook andere aspecten zoals het genetisch bepaald zijn van de lokale weerstand van de uier tegen binnendringende micro-organismen verdient vooral vanuit economische motieven hoge prioriteit. Voorgesteld wordt dat de Coördinatiecommissie Immunologisch Onderzoek de knelpunten in kaart brengt en de verdere aanpak in een werkplan vastlegt.

4. Toepassingen van de hybridoma-techniek in het landbouwkundig onderzoek.

Onderzoek op het terrein van de hybridoma-techniek ligt op het grensvlak van de biotechnologie, genetische manipulatie (celfusie) en immunologie. Op het ogenblik is, vooral in de humane sector, een aanzienlijke belangstelling voor deze techniek te constateren. In het landbouwkundig

onderzoek worden hybridoma's bereid op het Centraal Diergeneeskundig Instituut, de Landbouwhogeschool en het Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek. Bundeling van kennis en uitwisseling van informatie ligt voor de hand en enkele der betrokken onderzoekers hebben hiertoe een aanzet gegeven met het opzetten van een werkgroep, ressorterend onder de NRLO-Coördinatiecommissie Immunologisch Onderzoek.

Gezien de brede toepassingsmogelijkheden van hybridoma's zal er een groeiende vraag komen zowel in de dierlijke sector als in de plantaardige sector. Teneinde hierop adequaat in te kunnen spelen, is het noodzakelijk op korte termijn uitvoering te geven aan de reeds in het NRLO-Studierapport 'Biotechnologie in het landbouwkundig onderzoek', d.d. januari 1981, naar voren gebrachte gedachte om een service-laboratorium, bemand met een kleine staf, hiertoe op te zetten. Er dient een commissie te worden ingesteld met als taak om een voorstel voor de regio Wageningen te ontwerpen. De voorziening zal zowel voor de plantaardige als de dierlijke sector werkzaam zijn en zal zowel ten dienste staan van de instituten als van de vakgroepen. Op deze manier zal een duidelijke bundeling en taakverdeling op dit terrein kunnen worden gerealiseerd.

Samenstelling Begeleidingscommissie

Prof.Dr. J.G. van Bakkum, Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad.

Dr.Ir. P. de Boer, Vakgroep Erfelijkheidsleer, Landbouwhogeschool,
Wageningen.

Prof.Dr. J. Bouw, Vakgroep Zoötechniek, Fakulteit der Diergeneeskunde,
Rijksuniversiteit Utrecht.

Dr. G.J. Garssen, Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek, Zeist.

Prof.Dr. B. de Groot, ITAL, Wageningen.

Dr.Ir. S.H.M. Metz, Instituut voor Veevoedingsonderzoek, Lelystad.

Ir. D. Minkema, Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek, Zeist.

Dr. P.H. Pouwels, Medisch Biologisch Laboratorium TNO, Rijswijk.

DEEL 2

LEZINGEN, GEHOUDEN TIJDENS DE STUDIEDAG VAN DE
NRLO-CONTACTCOMMISSIE 'BIOCHEMISCHE-FYSIOLOGISCHE TECHNIEKEN
IN DE DIERLIJKE PRODUKTIE' d.d. 14 mei 1982

1. TOEPASSING VAN CELBIOLOGISCHE TECHNIEKEN IN DE DIERLIJKE PRODUKTIE

Dr.Ir. S.H.M. Metz, Instituut voor Veevoedingsonderzoek (IVVO),
Lelystad

De Nederlandse veehouderij levert thans een belangrijke, positieve bijdrage aan onze betalingsbalans. Het overheidsbeleid tracht, door gericht stimuleren van het veehouderij-onderzoek, deze nog steeds relatief gunstige situatie zo goed mogelijk te ondersteunen. De op de ons omringende landen bestaande voorsprong in efficiëntie en kwaliteit van de dierlijke produktie zal behouden en eventueel verder uitgebouwd moeten worden. Om dit te bereiken is allereerst handhaving van voldoende kwaliteit en kwantiteit van zowel fundamenteel als toegepast onderzoek over een breed front noodzakelijk. Bovendien is een goed rendement van de in onderzoek gedane investeringen slechts mogelijk wanneer sprake is van een wisselwerking tussen fundamenteel en toegepast onderzoek. Zij die toegepast onderzoek verrichten op het gebied van voeding, huisvesting, gezondheid, fokkerij, diergeneeskunde, vruchtbaarheid, enzovoort, kunnen zulks doeltreffend doen mits voldoende kennis van de fysiologie, anatomie en biochemie van de te gebruiken diersoort aanwezig is. Deze fundamentele kennis is noodzakelijk voor:

- een acceptabele keuze van de richting van het onderzoek
- een juiste vraagstelling bij de opzet van proeven
- een juiste interpretatie van verkregen uitkomsten.

Maar ook het fundamentele onderzoek moet gevoed worden vanuit het toegepaste onderzoek. Mij is in de afgelopen jaren meerdere malen gebleken dat vele fundamentele onderzoekers behoefte hebben aan ondersteuning vanuit het toegepaste onderzoek en motivatie putten uit mogelijke toepassing in de dierlijke produktie van de door hen vergaarde kennis. Er kan sprake zijn van een symbiose tussen toegepast en fundamenteel onderzoek, die voor beide partijen vruchten afwerpt.

Er van uitgaande dat fundamenteel onderzoek verband brengt in feitenmateriaal door er een theoretische grondslag aan te geven, kan dit onderzoek leiden tot een snellere voortgang van het toegepaste onderzoek en hieraan nieuwe perspectieven bieden. Het is dan ook terecht dat in de Meerjarenvisie Landbouwkundig Onderzoek 1982 - 1986 wordt geconstateerd dat voor wat betreft de dierlijke produktie extra activiteiten nodig zijn

op het gebied van biotechnologie, immunologie en genetische manipulatie. Deze extra activiteiten zullen, gezien het sterk internationale karakter van de fundamentele wetenschappen, voor een belangrijk deel moeten bestaan uit het goed op de hoogte blijven en bijhouden van de nieuwste ontwikkelingen in het buitenland. De voorsprong ten opzichte van de ons omringende landen, met betrekking tot de efficiëntie en de kwaliteit van de dierlijke produktie, kunnen we niet in de eerste plaats verkrijgen en handhaven door een voorsprong in het fundamentele onderzoek, maar wel door een efficiënte toepassing van basiskennis in het toegepaste onderzoek en daarmee in de dierlijke produktie. Dit stelt hoge eisen aan de fundamenteel onderzoeker met betrekking tot gevoel voor het landbouwhuisdier en aan de 'toegepaste' onderzoeker wat betreft kennis van basiswetenschappen en eveneens aan de integratie van resultaten van toegepast onderzoek in de dierlijke produktie. Voor een optimaal gebruik van onderzoekresultaten is een goede beheersing van de gehele dierlijke produktieketen noodzakelijk.

Deze wetenschappelijke vergadering met als thema 'toepassing van celbiologische technieken in het onderzoek naar de dierlijke produktie', heeft tot doel ons meer te informeren omtrent mogelijkheden en perspectieven die vanuit het fundamentele onderzoek naar de dierlijke produktie worden aangedragen. Ik hoop daarmee dat deze dag een wezenlijke functie zal vervullen in het geven van een stevig fundament aan een efficiënte en maatschappelijk aanvaardbare dierlijke produktie.

Ten aanzien van het programma nog twee opmerkingen:

1. Het woord biotechnologie komt niet in het programma voor. Beschouw dit niet als een omissie, want de organisatoren van deze dag, de heren Egberts, Garssen, Tamminga, De Vries en Metz hebben gemeend aan de term celbiologische technieken de voorkeur te moeten geven. Zij die daartoe behoefte gevoelen, kunnen in het programma voldoende biotechnologie proeven.
2. Genetische manipulatie staat ook niet als onderwerp op het programma. Wij hebben bij de opzet van deze dag thans de mogelijkheden van toepassing van genetische manipulatie in de dierlijke produktie als te ver weg beschouwd om er uitgebreid aandacht aan te schenken. Als contactcommissie zullen we de ontwikkelingen hierin evenwel niet uit het oog verliezen.

2. TOEPASSING VAN EMBRYO-TECHNIEKEN IN DE VETERINAIRE RESEARCH.

Prof.Dr. G.H. Zeilmaker, Erasmus Universiteit, Rotterdam

Daar waar de natuurlijke teeltkeus vervangen wordt door die van de mens treedt een grote fenotypische variatie op die kenmerkend is voor de domesticatie in het algemeen en in het bijzonder van die van huisdieren en landbouwhuisdieren.

Het tot stand komen van deze variatie is een proces dat vele eeuwen in beslag heeft genomen. De laatste tientallen jaren zijn grote vorderingen gemaakt met het verbeteren van met name runderrassen als gevolg van het toepassen van de kunstmatige inseminatie en het doen ingang vinden van het invriezen van sperma, welke technieken het mogelijk maken van één individu een groot aantal nakomelingen te verkrijgen. Zo kan van één stier zelfs na het beëindigen van het leven een tienduizendtal kalveren worden verkregen nadat tevoren een nakomelingentest is uitgevoerd. Langs deze weg wordt dus bereikt dat een snelle verspreiding van gewenste eigenschappen plaatsvindt.

Scheiding van zaadcellen

Een vraag die in verband met K.I. steeds gesteld wordt is: Zou het mogelijk zijn te komen tot een scheiding van X- en Y-chromosoomdragende zaadcellen zodat het geslacht van de nakomelingen niet meer van het toeval afhankelijk is. Sinds het bekend is dat de X- en Y-dragende zaadcellen van de mens onderscheiden kunnen worden op basis van de fluorescentie van het Y-chromosoom zijn talrijke studies verricht om zaadcelfracties te verrijken. Regelmatig verschijnen publikaties waarin beweerd wordt dat een kolomscheiding een verrijking van zaadcellenfracties bij de mens zou kunnen veroorzaken. Het aantal ontkennende publikaties is echter minstens zo groot en er is theoretisch geen enkele basis voor kolom- of gradiëntscheiding als methode voor zaadcellscheiding. De DNA-massa die in de X- en Y-zaadcellen enkele procenten verschilt zou theoretisch een uitgangspunt kunnen zijn voor een scheiding op verschil in massa. Hier staat echter tegenover dat het soortelijk gewicht van de zaadcellen niet verschillend behoeft te zijn wanneer het volume veranderd is. Ieder die met zaadcellen heeft gewerkt weet dat er een enorme variabiliteit tussen de zaadcellen onderling is en een groot probleem bij het scheidingsonderzoek met runderzaadcellen zal zijn het evalueren van een

potentiële verrijking. Immers het aantal nakomelingen dat verkregen kan worden in een bepaald onderzoek zal beperkt zijn. Het verschil in erfelijke aanleg tussen de X- en Y-dragende zaadcellen zou theoretisch benaderd kunnen worden door middel van een immunologische binding van bijvoorbeeld genprodukten uit deze zaadcellen. Belangrijk is echter zich in dit verband te realiseren dat haploïde-expressie, dat wil zeggen gentranscriptie, niet wordt waargenomen in zaadcellen. Wel bevindt zich mogelijk nog wat mRNA van vóór de tweede meiotische deling in de cel. Eventuele uiterlijke verschillen tussen zaadcellen worden derhalve veroorzaakt door het diploïde genotype van de spermatocyten en de Sertollicellen in de testis en zijn niet een gevolg van de expressie van de erfelijke inhoud van de zaadcel.

Tijdstip van bevruchting en ovulatie

In de klinische literatuur wordt van tijd tot tijd melding gemaakt van het feit dat een late coïtus met betrekking tot het ovulatietijdstip meer mannelijke nakomelingen zou geven. Elke solide endocrinologische of gynaecologische onderbouwing van deze bewering ontbreekt echter. De indrukken zijn gebaseerd op interviews achteraf.

Samenvattend mogen we concluderen dat de K.I. vèruit de belangrijkste methode is en blijft voor het op bepaalde kenmerken verbeteren van de bestaande runderrassen.

Bij het vrouwelijk individu zou men zich een soortgelijke ontwikkeling als bij de K.I. kunnen voorstellen. Hoe kunnen wij dan bijvoorbeeld een grote toename in het aantal nakomelingen van één vrouwelijk dier verkrijgen. Wat zou de waarde zijn van deze benadering die ongetwijfeld moeilijker te realiseren is dan K.I. De genetische bijdrage van zaadcel en eikel zijn gelijk en de betekenis van het vergroten van het aantal nakomelingen van vrouwelijke dieren moet dan ook niet gezien worden in het licht van een grotere verspreidingsmogelijkheid van gewenste kenmerken, want daar is de K.I. meer voor geschikt, doch in een mogelijkheid een combinatie van erfelijke eigenschappen te verbreiden op grotere schaal dan voorheen. Een combinatie van eigenschappen in de zin van ras of hybride tussen twee geselecteerde individuen, welke na de bevruchting in het genotype van het embryo kan zijn vastgelegd. Normaliter kunnen per

geschikt koppel runderen per jaar niet meer dan één of twee nakomelingen worden verkregen. Gedurende een runderleven loopt het aantal op tot acht à tien. Welke mogelijkheden zijn er om dit aantal te vergroten.

Superovulatie

In gunstige gevallen kan behandeling met hormonen leiden tot het vrijkomen van zes tot tien eicellen per cyclus die na K.I. als embryo's geïsoleerd kunnen worden. De praktijk heeft echter geleerd dat dit verschijnsel zeer moeilijk voorspelbaar te realiseren is. Verder onderzoek op dit terrein is daarom nodig. Zo is bij proefdieren bijvoorbeeld gevonden dat superovulatie alleen succesvol geïnduceerd kan worden indien geen rijpende follikels in het ovarium aanwezig zijn bij het begin van de hormoonbehandeling. Heeft zich al een duidelijke follikelhierarchie ingesteld dan werken de toegediende gonadotropines in op de enkele grote follikels in het ovarium en komen slechts weinige eicellen vrij. Bij ratten is het bijvoorbeeld praktisch onmogelijk een groot aantal eicellen vrij te maken in volwassenheid doch als prepuberale dieren is het eenvoudig. Bij hamsters lukt het alleen als het follikelstimulerend hormoon direct na de voorafgaande ovulatie wordt toegediend, op een tijdstip dat er geen nieuwe rijpende follikels aanwezig zijn. Bij het rund ligt hier een belangrijk onderzoeksterrein braak waarbij leeftijd, cyclusstadium, hormonen als variabelen onderzocht moeten worden.

Eicelweek en follikelweek

Een doorbraak op het gebied van de beïnvloeding van de eicelvorming zal worden bereikt indien de eicellen uit slachthuismateriaal beschikbaar zouden komen uit bijvoorbeeld slachtkalveren. Naast het voordeel van de korte levensfase (generatieduur) is daar het grote potentiële aantal dat in principe voorhandig is.

Bij runderen is de bevruchting in vitro vrijwel niet mogelijk, doch bij andere diersoorten wel. Transplantatie van onbevruchte eicellen naar het oviduct gevolg door bevruchting is bij het rund tot op heden de aangewezen weg om van een eicel een nakomeling te verkrijgen. Een drastische vermeerdering van het aantal eicellen door het ovarium van slachtdieren als uitgangsmateriaal te gebruiken lijkt dus voorlopig niet bij te dragen tot de ontwikkeling van een praktisch hanteerbare methode van beïnvloeding van de voortplanting van genetisch gewenste individuen. Voorts

verdwijnt de betekenis van deze benadering voor een deel wanneer ongeselecteerd slachthuismateriaal als uitgangspunt wordt gebruikt. Concluderend kunnen we dus opmerken dat naast de K.I. alleen de superovulatiebehandeling gevolgd door embryo-isolatie en embryotransplantatie uitzicht geven op een technische mogelijkheid een groot aantal nakomelingen van geselecteerde genotypen te produceren in ongeselecteerde ontvangstermoeders. In de Verenigde Staten zijn van één koe meer dan honderd nakomelingen gemeld.

Het invriezen van embryo's

Door middel van een thans uitgewerkte invriesmethode is het mogelijk het moment van winnen van embryo's te scheiden van dat van de transplantatie. Recent onderzoek in de Verenigde Staten heeft mogelijk gemaakt het ontdooien en verder behandelen van embryo's binnen 5 minuten te realiseren en er is bovendien een methode ontwikkeld die ontdooien en transplanteren in één handeling zonder embryomanipulatie mogelijk maakt. Het is dan ook te voorzien dat er in de toekomst een wijziging zal ontstaan in de kosten verbonden aan het ontdooien en transplanteren van runderembryo's.

Ontwikkelingen bij toepassing van embryotransplantatie

1. Het aanleggen van een embryobank van lokale en uitheemse runderrassen.
2. Het bevorderen van de diversificatie van de veestapel.
3. Het ontwikkelen van 'vleesrunderen' in melkvee en omgekeerd. Snelle aanpassing van veestapel van economische behoeften en mogelijkheden (K.I. levert 50%, E.T. 100% nieuwe genen).
4. Snelle selectie van rassen door korte generatietijd en groter aantal nakomelingen.
5. Een hogere produktie van K.I.-stieren.
6. Tweelingdracht bij vleesrunderen.
7. Sexen van embryo's - tweelingdracht bij melkvee.
8. Transportmogelijkheden over grenzen.

Samenhangend met deze mogelijke ontwikkelingen is onderzoek vereist naar de vraag welke rassencombinaties (donor-ontvangster) mogelijk zijn zonder obstetrische complicaties.

Onderzoek over het sexen van runderembryo's

Aangezien Y-chromosoomtranscriptie plaatsvindt tijdens de preïmplantatie-ontwikkeling bleek in een studie van Epstein met muize-embryo's dat het mogelijk is met een antiserum tegen het zogenaamde muize-Y-antigeen 50% van de embryo's te vernietigen in vitro en vrijwel uitsluitend vrouwelijke embryo's over te houden. Het is duidelijk dat toepassing van een dergelijke techniek bij het rund van het grootste belang zou zijn ten-einde tweelingdracht te induceren na embryotransplantatie zonder kans op free-martinisme. Dit vereist echter het verkrijgen van een runder-Y-antigeen, tenzij het in ingeteelde muizen verkregen antigeen ook bij andere diersoorten werkzaam zou zijn. Cytogenetische technieken voor het vaststellen van het geslacht van runderembryo's zijn in principe aanwezig doch te tijdrovend en te moeilijk om tot een praktische benadering van de geslachtsbepaling te komen. Sinds kort is het mogelijk met behulp van fluorescerende antilichamen tegen het muize-Y-antigeen runderembryo's te sexen met vrijwel 100% betrouwbaarheid!

Technieken met mogelijke betekenis voor de toekomst

Embryoklieving

Het microchirurgisch in tweeën delen van morula's levert in principe twee identieke nakomelingen (principe van ééneiïge tweeling). Deze zullen altijd van hetzelfde geslacht zijn dus tweelingdracht mogelijk, ook bij melkvee. Op grote schaal worden in de USA embryo's gekliefd en tweelingdrachten tot stand gebracht.

Diploïdisatie van de eicel

Het verwijderen van één van de twee pronucleï uit de zygote gevolgd door diploïdisatie van de achterblijvende kern levert theoretisch een homozygoot vrouwelijk dier op. Het genotype is echter niet gelijk aan het ouderdier. Betekenis voor produktie niet duidelijk. Deze techniek is bij een beperkt aantal muizen toegepast.

Samenvatting

Experimenteel onderzoek lijkt gewenst op de volgende gebieden:

- inductie van superovulatie
- sexen van embryo's met anti-Y-serum
- klieven van embryo's

één en ander naast een actief embryotransplantatieprogramma.

3. DE PRAKTISCHE TOEPASSING VAN EMBRYO-TRANSPLANTATIE (E.T.) BIJ HET RUND

Drs. H. Hoogenkamp, Vakgroep Verloskunde K.I. en Voortplanting,
 Fakulteit der Diergeneeskunde, Utrecht

Inleiding

Hoewel het verzamelen van embryo's bij het rund zowel chirurgisch als niet-chirurgisch mogelijk is wordt het tegenwoordig vrijwel altijd niet-chirurgisch gedaan. Alleen op die manier is het mogelijk E.T. meerdere keren toe te passen bij dezelfde donor zonder dat schade aan het dier wordt toegebracht. Meestal heeft men de donor eerst hormonaal behandeld, zodanig dat een superovulatie is opgetreden, zodat in plaats van één, meerdere embryo's tegelijk verzameld kunnen worden.

In het algemeen spoelt men de donoren op de 7e of 12e dag van de gesuperovuleerde cyclus (dag van oestrus is dag 0).

Het is weliswaar technisch mogelijk om embryo's niet-chirurgisch te verzamelen na de 4e dag van de cyclus (het moment dat de embryo's vanuit het oviduct in de uterus komen) tot ongeveer de 20e dag (het moment waarop een verkleving tussen endometrium en allanto-chorion optreedt), echter na dag 15 zijn er geen geschikte ontvangsters omdat op dag 16 prostaglandine F_{2α} vrijkomt dat het corpus luteum in regressie doet gaan, zodat het dier in oestrus komt, ook al wordt er nog een embryo in de uterus gebracht. Bovendien is de kans op beschadiging van het embryo door z'n grote afmetingen na dag 13 aanzienlijk. Tussen dag 8 en dag 11 zijn de embryo's moeilijk te vinden doordat ze op dag 8 uit de zona pellucida zijn gekomen en nog niet groot genoeg zijn om zonder de zona pellucida makkelijk herkend te kunnen worden.

Vóór dag 6 is het ontwikkelingsstadium van het embryo zodanig dat het gevoeliger is voor veranderende omstandigheden dan na dag 6.

Na het spoelen van de donor worden de embryo's in de verzamelde vloeistof opgespoord en op kwaliteit beoordeeld en vervolgens direct of na een bepaalde behandeling zoals vriezen, sexen of delen getransplanteerd naar een geschikte ontvangster. Het transplanteren kan ook weer zowel chirurgisch als niet-chirurgisch plaatsvinden. In Nederland is het gebruikelijk dat de hele methode, dus zowel het verzamelen als het transplanteren niet-chirurgisch geschiedt, zowel om economische als ethische motieven. De recipiënt moet wat haar sexuele cyclus betreft synchroon lopen met de donor. Het geeft nogal eens problemen om een voldoende groot aantal reci-

piënten beschikbaar te hebben, waardoor er grote behoefte is ontstaan de embryo's gedurende langere tijd te conserveren. Dit kan door ze in te vriezen en in vloeibare stikstof te bewaren. Een probleem voor een groot-schalige toepassing vormen nog steeds de kosten, die in verhouding tot de opbrengst relatief hoog zijn. Daardoor is er vrijwel alleen interesse in kringen van topfokkers en K.I. verenigingen. Ook zou E.T. voordelen bieden bij in- en export van vee, terwijl het veranderen van ras sneller kan verlopen dan met de tot nu toe gebruikelijke manier van verdringings-kruizingen.

Omdat gebleken is dat donorkoeien na E.T. in het algemeen zeer vlot drachtig worden, wordt de methode soms gebruikt bij het behandelen van repeat-breeders, terwijl het verzamelen van embryo's na superovulatie ook diagnostisch gebruikt kan worden bij een vermoeden op het aanwezig zijn van een oviduct obstructie.

Methoden

Na een onderzoek op geschiktheid wordt de donorkoe tussen dag 9 en 14 van de cyclus (dag van oestrus is dag 0) geïnjecteerd met 3000 E PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin) terwijl 48 uur later een analoog van prostaglandine F2 α wordt gegeven waardoor de donor na gemiddeld nog eens 48 uur in oestrus komt. In deze oestrus dient geïnsemineerd te worden. De ontvangsters krijgen prostaglandines tegelijk met de donor om de cyclus van de donor en recipiënt synchroon te krijgen. Omdat de oestrus niet bij elk dier even snel na de prostaglandine injectie optreedt is een goede oestrus controle en administratie daarvan voor een groot deel bepalend voor het al of niet slagen van de E.T.

Voordat met het verzamelen van embryo's begonnen wordt, krijgt de donor een sacrale epiduraal anaesthesie toegediend om zó het rectum stil te leggen waardoor de kans op beschadiging van het rectum verkleind wordt, het manipuleren via het rectum van het geslachtsapparaat vergemakkelijkt wordt en het verontreinigen van de vulva en omgeving grotendeels voorkomen wordt. Nadat de vulva en haar omgeving is gereinigd wordt een éénweg Foley katheter voorzien van een stilet via de cervix in één van beide uterushoornen geschoven en in een uterushoorn gefixeerd door het aan het eind aanwezige ballonnetje op te blazen. Tevens voorkomt het ballonnetje later, dat in de uterushoorn aangebrachte vloeistof langs een andere weg dan via de katheter er weer uit kan.

Na het verwijderen van de stilet wordt de katheter via een slangensysteem aangesloten op een fles met 1 liter fosfaatbuffer. Door nu afwisselend 25-100 ml (afhankelijk van de grootte van de uterus) van de fosfaatbuffer in de hoorn te laten lopen en vervolgens op te vangen in een glas of fles wordt de uterushoorn meerdere malen gespoeld (totaal 500 ml per hoorn). Na het spoelen van de ene hoorn wordt een katheter in de andere hoorn geschoven en wordt deze hoorn gespoeld. De fosfaatbuffer wordt nu gefiltreerd en het residu wordt onder een microscoop op aanwezigheid van embryo's gecontroleerd. De gevonden embryo's worden gegroepeerd en beoordeeld en vervolgens getransplanteerd. Hiertoe wordt een embryo in een inseminatie rietje opgezogen en in een gemodificeerde inseminatie pipet geschoven. De ontvangster koe wordt voorbehandeld als de donor (anaesthesie en reinigen) en vervolgens wordt de pipet via de cervix in de gewenste (= ipsilaterale uterushoorn ten opzichte van het corpus luteum bevattend ovarium) hoorn gedeponeerd. Wanneer er onvoldoende ontvangsters zijn kan het surplus aan embryo's (mits het ongeveer 7 dagen oude embryo's betreft, omdat oudere embryo's het invriezen niet zullen overleven) worden ingevroren. Daartoe wordt stapsgewijs DMSO toegevoegd en vervolgens wordt de ampul, waarin het embryo en medium, afgekoeld tot -6°C .

Bij deze temperatuur wordt kunstmatig een langzame kristallisatie opgewekt door het in de ampul aanbrengen van kristallisatie kernen. Hiermee wordt voorkomen dat later, tijdens het nu volgende langzame afkoel traject, een spontane snelle kristallisatie optreedt die de temperatuur in de ampul door vrijkomende kristallisatiewarmte sterk zou doen fluctueren. De temperatuur wordt nu met $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ afgekoeld tot de gewenste temperatuur (tussen -30°C en -45°C) is bereikt. Vervolgens wordt de ampul in de vloeibare stikstof gedompeld en daarin opgeslagen.

Bij het ontdooien wordt de ampul snel opgewarmd in een waterbad van 35°C . Vervolgens wordt de DMSO verwijderd, waarna het embryo normaal getransplanteerd kan worden.

Resultaten

De laatste 2 jaren werden vanuit de Kliniek voor Verloskunde op verschillende bedrijven totaal 94 koeien gesuperovuleerd. Van deze groep koeien werden 4 dieren niet tochtig, vertoonden 18 dieren twee of minder ovulaties en was van één dier de cervix niet passabel voor de spoelkatheter, zodat uiteindelijk 71 dieren (75.5%) gespoeld werden.

In deze 71 dieren werden via rectale exploratie 603 corpora lutea (CL) geteld, zodat gemiddeld 8.5 CL per gespoelde donor aanwezig waren. Het aantal embryo's plus onbevuchte eicellen dat uit deze groep dieren werd verzameld bedroeg 324, dus 53.7% ten opzichte van het aantal corpora lutea. Dit resulteerde dus in 4.6 embryo's plus eicellen per gespoelde donor. Hiervan had 65.7% een goede kwaliteit.

Er werden 68 goede embryo's getransplanteerd, hetgeen in 38 kalveren resulteerde (56% drachtig). De andere embryo's werden gebruikt voor andere experimenten of waren van slechte kwaliteit.

Na behandeling met de beschreven methode van invriezen werden 29 embryo's getransplanteerd naar pinken. Hieruit ontstonden 6 kalveren, hetgeen resulteert in een drachtigheidspercentage van 20.7%.

Discussie

Wanneer de resultaten in genoemd materiaal geanalyseerd worden valt op dat het gemiddeld aantal kalveren per donor klein is (1.7 kalf/donor), terwijl de resultaten na diepvriezen nog beduidend lager liggen.

Verbeteringen zijn ongetwijfeld mogelijk. Echter de meest beperkende factor is de respons op de superovulatie behandeling. De onvoorspelbare grote variatie in de respons op een superovulatie behandeling is grotendeels toe te schrijven aan een individuele variatie in gevoeligheid en is derhalve niet te beïnvloeden. Dit houdt in dat met de huidige superovulatie technieken de resultaten van E.T. en dus de prijs per E.T. kalf slechts weinig te verbeteren zijn.

Wat betreft het diepvriezen, door in plaats van DMSO, glycerine te gebruiken zouden volgens meerdere recente bronnen de resultaten 10 tot 25% verbeterd kunnen worden, zodat dan over een bruikbare methode gesproken kan worden.

Om het aantal kalveren per donor te vergroten zal het door klieven vermeerderen van embryo's wel eens een bruikbare methode kunnen worden. Deze methode bevindt zich echter nog in de beginfase en is zeker nog niet voor praktische toepassing geschikt.

De conclusie moet zijn dat E.T. bij het rund niet-chirurgisch goed mogelijk is, maar dat het voor een gemiddelde veehouder in verhouding tot de opbrengst te duur is.

Literatuur

Brand, A. und H. Hoogenkamp. Embryo transfer. In Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Ed. Grunert/Berchtold. Paul Parey Verlag, Berlin Hamburg 1982.

Mapletoft, R.J., W.H. Johnson and D.M. Miller. Embryo transfer techniques in handling repeat breeding cows. Theriogenology 13, no.1, 103, 1980.

Lehn-Jensen, H., T. Greve and A. Perez Navas. Two step freezing of cow embryo's in 1.4 M glycerol. Theriogenology 15, no. 14, 427 - 432, 1981.

Lehn-Jensen, H. and T. Greve. The survival of cow blastocysts frozen in 1.4M glycerol after plunging between -15° and -60°C and rapid thawing. Theriogenology 17, no. 1, 95, 1982.

Schilling, E. Ergebnisse von Superovulationsbehandlungen. Variabilität und deren Ursachen. Congres Wels, 1982.

Seidel, G.E. Jr. Applications of microsurgery to mammalian embryos. Theriogenology 17, no. 1, 23-33, 1982.

4. MOGELIJKE TOEPASSINGEN VAN CLONERINGSTECHNIKEN IN DE DIERLIJKE PRODUKTIE

Dr. D.F.M. van de Wiel, Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek
'Schoonoord', Zeist

Inleiding

De genetische variatie die het resultaat is van de normale geslachtelijke voortplanting heeft tot gevolg dat er binnen elke populatie van landbouwhuisdieren individuen zijn, die méér dan het gemiddelde dier beschikken over de genetische aanleg tot bepaalde door de mens gewenste eigenschappen. Hiervan wordt dan ook gebruik gemaakt, doordat deze dieren selectief worden vermeerderd via stamboeken, nakomelingenonderzoek, kunstmatige inseminatie, embryotransplantatie en inteeltlijnen.

Een ander gevolg van de grote variatie die ontstaat door geslachtelijke voortplanting is het ontstaan van enkele individuele dieren met een zeer gewenst fenotype, zoals bijvoorbeeld een hoogproductieve melkkoe of een winnend renpaard.

Door recente ontwikkelingen op het gebied van de celbiologie is het in principe mogelijk geworden om exacte genetische kopieën (= clonen) te maken van bepaalde dieren die om één of andere reden extra gewenst zijn. Met enkele van deze technieken, zoals diploïdisering van de eicel van homozygote moederdieren, of transplantatie van de kern van een somatische cel in een eicel of in een zygote, kan in principe een genetische kopie worden gemaakt van een volwassen dier. Prof. Zeilmaker heeft in zijn lezing deze cloneringstechnieken reeds gedetailleerd behandeld. Helaas is het zo dat de technische problemen om langs deze weg tot werkelijke productie van clonen te komen, nog lang niet zijn opgelost, al zijn er wel reeds via de diploïdisatietechniek enkele homozygote muizen geproduceerd (Hoppe & Illmensee, 1977).

Een techniek waarmee het inderdaad mogelijk is om genetische kopieën te maken van een individueel dier, is de techniek van embryoklieving, in combinatie met embryotransplantatie. Weliswaar kunnen langs deze weg slechts kopieën worden gemaakt van embryo's, en niet van volwassen dieren. Bovendien is het aantal op deze wijze geproduceerde kopieën waarschijnlijk beperkt tot 4. Niettemin zou men, door één embryo zich te laten ontwikkelen en de overige voorlopig in te vriezen, de eigenschappen van verschillende clonen kunnen testen, om vervolgens de beste embryo's

uit te kiezen voor verdere produktie. In elk geval is het reeds mogelijk om via de techniek van embryoklieving en -transplantatie, het aantal nakomelingen van vóór geselecteerde afstamming te vergroten. Voorlopig liggen de voordelen van deze cloneringsstechniek echter vooral nog op het vlak van het wetenschappelijk onderzoek, zoals beschreven zal worden in de discussie.

Resultaten

In 1970 verscheen de eerste publikatie (Mullen et al.), waarin het kunstmatig tot stand brengen van identieke zoogdiertweelingen werd beschreven. Deze onderzoekers kweekten in vitro, ééncellige muis-blastomeren (= cellen afkomstig van een méércellig embryo) tot morulae, waarna zij embryo-transplantatie toepasten. Uit onderzoek van Moustafa et al. (1978) bleek dat de resultaten aanzienlijk konden worden verbeterd door morulae eenvoudig in twee helften te snijden, en de helften te transplanteren in receptor muizen. Op deze manier werden 8 stel identieke tweelingen verkregen.

De eerste onderzoeker die op deze wijze identieke tweelingen produceerde van landbouwhuisdieren was Willadsen (1979). Hij slaagde erin om 5 stel identieke tweelingschappen te maken door blastomeren van 2-cellige embryo's van elkaar te scheiden en tijdelijk te voorzien van een kunstmatige zona pellucida van agar. Het bleek niet alleen mogelijk om gehalveerde 2-cellige blastomeren voor dit doel te gebruiken, maar ook gehalveerde 4- en 8-cellige blastomeren. Op deze wijze werden 3 stel identieke tweelingschappen geproduceerd, en nog eens 3 stel nadat deze enige tijd ingevroren waren geweest (Willadsen, 1980).

Ook bij runderen bleek deze techniek te kunnen worden toegepast, waarbij ditmaal uit kwart-embryo's van 8-cellige blastomeren één identieke drieling en 2 stel identieke tweelingen werden geboren (Willadson & Polge, 1981). Tevens bleek het mogelijk om rundermorulae van 5 of 6 dagen oud, dat wil zeggen op een leeftijd waarop doorgaans embryotransplantaties bij runderen worden uitgevoerd, te halveren waardoor de efficiëntie en de economie van embryotransplantatieprogramma's kan worden verbeterd. De slagingskans bleek echter aanzienlijk kleiner indien kwart-embryo's van dag 5 morulae werden gebruikt (Willadsen et al., 1981). Wel bleek het mogelijk om, bij het schaap, uit kwart-embryo's één identieke vierling en verscheidene identieke drielingen te laten ontstaan (Willadsen, 1981).

Een groep Franse onderzoekers slaagde er onlangs in om de techniek aanzienlijk te vereenvoudigen, door de gehalveerde embryo's direct te transplanteren, zonder gebruikmaking van de agar coating. Op deze wijze werden 6 identieke tweelingen verkregen uit 16 gehalveerde dag 6 - dag 7 runder-embryo's (Ozil, 1981).

Met gebruikmaking van soortgelijke technieken is het daarnaast ook mogelijk gebleken om chimaeren te produceren. Door 2 ééncellige blastomeren, afkomstig van twee verschillende morulae, samen te brengen, ontstaat een chimaer, waarbij echter de kans bestaat dat slechts één van beide celtypen in het volwassen dier aanwezig is. Zo werden 4 identieke blastocysten geproduceerd door cellen afkomstig van een Hereford morula te combineren met cellen van een Friesian morula. Twee van de 4 embryo's ontwikkelden zich tot Hereford-Friesian chimaeren, en de andere 2 ontwikkelden zich tot zuivere Hereford kalveren. Eén van de chimaeren was hoofdzakelijk van het Hereford type, maar had grote zwarte vlekken op de huid afkomstig van het Friesian embryo, terwijl de ander hoofdzakelijk van het Friesian type was, maar met grote bruine vlekken afkomstig van het Hereford embryo (ARC-report 1980-1981).

Species verschillen blijken hierbij geen onoverkomelijke barrière. Tijdens mijn recent bezoek aan het ARC Institute of Animal Physiology in Babraham liet men mij een chimaer zien die afkomstig was van een schaap en een geit-embryo. Het dier had het uiterlijk van een schaap, maar de vacht bestond afwisselend uit schape- en geiteharen.

Discussie

De voordelen van het produceren van clonen door middel van de techniek van embryoklieving en -transplantatie kunnen als volgt puntsgewijs worden samengevat.

- Reductie van de genetische variatie in wetenschappelijke experimenten. Door gebruik te maken van ééneiïge tweelingen van voorgeselecteerde afstamming en zelf te kiezen leeftijd, kan men de genetische en de omgevingsfactoren die van invloed zijn op bepaalde te bestuderen kenmerken, veel beter van elkaar onderscheiden.
- Produktie van genetische kopieën van individuele dieren met uitzonderlijk gewenst fenotype.

Dit is nog slechts in beperkte mate mogelijk, namelijk door invriezen van een deel der ééneiïge tweelingen of meerlingen, in afwachting van de eigen-

schappen die de niet-ingevroren clonen zullen blijken te bezitten.

De meest kansrijke methode lijkt op den duur te zijn de transplantatie van kernen van somatische cellen in eicellen; waarschijnlijk zullen hiervoor echter nog jaren van ontwikkelingswerk nodig zijn. De beste kandidaten voor donorcellen zouden wellicht spermatogonia zijn.

Overigens kan men verwachten dat over het algemeen de langs deze weg verkregen clonen weliswaar fenotypisch erg op elkaar zullen lijken, maar dat zij minder aan elkaar gelijk zullen zijn dan het geval is bij ééneiïge tweelingen. Dit is een gevolg van verschillen zowel in uterine milieu als in omgevingsfactoren na de geboorte. Verschillen in fenotype zouden zelfs erg groot kunnen zijn bij kenmerken met een lage erfelijkheidsgraad, zoals reproductiekenmerken of melkproductie; bij deze kenmerken ontstaat de variatie normaal gesproken meer door de omgeving dan door het genotype.

Ook een aantal genetische verschillen tussen clonen kan men verwachten. Eén oorzaak van mogelijke verschillen berust op de waarschijnlijk maternale vererving van het mitochondriale genoom en de mogelijk eveneens maternale vererving van het centriolen genoom. Een andere bron van functionele genetische variatie is de willekeurige inactivatie van één der beide X-chromosomen in vrouwelijke individuen. Overigens lijkt het onwaarschijnlijk dat clonering een rol zal spelen bij het produceren van grote aantallen dieren voor directe produktiedoeleinden. Hiervoor zijn de technieken (nog) te ingewikkeld en te duur.

- Produktie van enkele genetische kopieën van individuele dieren met een uitzonderlijk gewenst genotype ten behoeve van de fokkerij.

Zelfs als de cloneringstechnieken ingewikkeld en kostbaar zijn kan men verwachten dat ze, op deze manier toegepast, zeer veel profijt zullen opleveren. In Amerika verwacht men op den duur een toepassing op dezelfde schaal als bij embryo-transplantatie (Seidel, 1980).

- Produktie van lijnen van dieren met een hoog percentage van een ongewoon kenmerk (bijv. tweelinggeboorten bij runderen), snelle produktie van in-teeltlijnen en automatische selectie op geslacht.

Deze toepassingsmogelijkheden spreken voor zichzelf. Automatische selectie op geslacht is echter alleen mogelijk bij de diploïdisatie-techniek, waarbij uitsluitend vrouwelijke dieren ontstaan.

Nadelen van clonering zijn:

- Clonering is waarschijnlijk (voorlopig) een moeizame techniek met een lage kans op succes.
- Clonering is (voorlopig) zeer kostbaar.
- Naast de problemen van het cloneren zit men ook altijd vast aan de problemen van het kweken en transplanteren van embryo's.
- Het is (voorlopig) onmogelijk om kopieën te maken van volwassen dieren.
- Ten gevolge van clonering kan er een vermindering ontstaan van de genetische variatie in een populatie.
- De economie van de producenten van zuivere rassen kan erdoor worden verstoord.

Tenslotte lijkt ook de diersoort een factor te zijn die de toepasbaarheid van cloneringstechnieken mede bepaalt. Clonering zal het meest van belang zijn voor monotoke dieren met een lang generatie-interval, zoals runderen en paarden. Bij diersoorten zoals schapen en geiten zal clonering minder snel tot toepassing leiden en bij dieren met meerdere nakomelingen in een worp, zoals konijnen en varkens, is de praktische toepasbaarheid waarschijnlijk het kleinst.

Literatuur

- Agricultural Research Centre, Institute of Animal Physiology, Cambridge, Report for 1980-1981, pp. 68-70.
- Hoppe, P.C. and K. Illmensee (1977). Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 74, 5657-5661.
- Mullen, R.J., W.K. Whitten and S.C. Carter (1970). In: Annual Report of the Jackson Laboratory, pp. 67-68. Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA.
- Moustafa, L.A. and J. Hahn (1978). Experimentelle Erzeugung von identischen Mausezwillingen. *Dtsch.Tierärztl.Woch.* 85, 242-244.
- Ozil, J.P., Y. Heyman and J.P. Renard (1981). Production of monozygotic twins in cow by micromanipulation and cervical transfer. *Proc. Fourth Anglo-French Meeting of the Society for the Study of Fertility and the Société Nationale pour l'Etude de la Sterilité et de la Fécondité*, Cambridge 16-18 Dec. 1981, p.10.
- Seidel, G.E. (1980). Potential application of cloning in animal industry. *Proc. 9th Internat.Congr.Anim.Reprod. & A.I.*, Madrid 1980, Vol. II, pp. 363-370.

Willadsen, S.M. (1979). A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277, 298-300.

Willadsen, S.M. (1980). The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in sheep. *J. Reprod.Fert.* 59, 357-362.

Willadsen, S.M. and C. Polge (1981). Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet.Rec.* 108, 211-213.

Willadsen, S.M., H. Lehn-Jensen, C.B. Fehilly and R. Newcombe (1981). The production of monozygotic twins of preselected parentage by micro-manipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology* 15, 23-29.

Willadsen, S.M. (1981). The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J.Embryol.exp. Morph.* 65, 165-172.

Discussie 'blok' 1

Alink concludeert uit Hoogenkamp's voordracht dat hij als invriestechiek voor muizenembryo's de zogenaamde 'tweestaps koelmethode' volgt, een aantal jaren geleden ontwikkeld door Farrant (U.K.), als vervanging van de geprogrammeerde invriesmethode. Een verschil is dat Farrant vanaf -20°C naar vloeibare stikstoftemperatuur koelt, terwijl Hoogenkamp lagere temperaturen (dan -20°C) onderzocht heeft en vindt dat tussen -30°C en -40°C de optimale temperatuur ligt. Alink c.s. vonden eveneens dat bij het invriezen van gedifferentieerde hartcellen -30°C een hogere opbrengst gaf dan -20°C . Een nog verdere verbetering van de 2-stapsmethode ten aanzien van overleving was te verkrijgen wanneer men het traject van 0 tot -20°C snel doorloopt en vervolgens tot -30°C langzaam koelt.

Alink vraagt of Hoogenkamp deze methode met embryo's ook volgt.

Hoogenkamp: Daar kan ik heel kort over zijn. Ik koel vanaf -6°C tot -30°C lineair. Aan onderzoek binnen dat traject zijn we nog niet toegekomen.

Alink: U vindt een overleving van ruwweg 30%?

Hoogenkamp: 80% overleving in een reageerbuis en na transplantatie tot 20 à 30% zowel voor het rund als voor de muis.

Alink: U vindt dat met betrekking tot het succes van het invriezen, het ontwikkelingsstadium van de embryo's sterk bepalend is. Embryo's ouder dan 12 dagen kunnen, dacht ik, niet meer gereanimeerd worden. Mijn vraag is of dit samenhangt met de grootte van het embryo na die 12 dagen of met het ontwikkelingsstadium. Wanneer er samenhang is met de grootte, dan lijkt het me mogelijk om door middel van klieving een dusdanige verkleining te verkrijgen dat na die periode succesvol ingevroren kan worden.

Hoogenkamp: Ik denk dat je die verder ontwikkelde embryo's moeilijk zodanig kunt klieven dat ze overleven. Naar mijn idee speelt het ontwikkelingsstadium (na dag 10) een rol.

Buis: Naar aanleiding van de hybride schaap-geit in Van de Wiel's voordracht, vraag ik me af of dit iets bijzonders is, of dat men ook via natuurlijke dekking zo iets kan verkrijgen. Is er een relatie tussen deze bastaard en bijvoorbeeld muilddier en -ezel? Met andere woorden is deze hybride vruchtbaar?

Zeilmaker: Het gaat niet om hybriden, maar om een chimere, dat wil zeggen een gemengd embryo. Wanneer een chimere muis die in elk laboratorium gemaakt kan worden, nakomelingen krijgt, dan zijn de geslachtscellen afkomstig van één van de twee componenten of van beide. Dus die geslachtscellen hebben het genotype van één van de componenten en die zijn of van het schaap of van de geit in dit geval. Dus die nakomelingen zijn volkomen normaal: schaap of geit.

Het belang van het chimere-onderzoek, dat bij muizen op grote schaal mogelijk is, is dat blijkt dat elk orgaan in het lichaam (oog, lever, milt etc.) nooit afkomstig is uit één cel, maar uit een populatie van cellen, want elk orgaan in het lichaam in deze experimentele chimeren, kan chimeer zijn.

Van de Wiel: Het bijzondere is dat dit het eerste voorbeeld is van een chimere afkomstig van een schaap en een geit. Dit is vrij recentelijk gelukt en of het dier vruchtbaar is werd nog niet bekeken.

Buis: Wat beoogt men hiermee?

Van de Wiel: Voor zover mij bekend beoogt Willadsen hiermee alleen fundamenteel onderzoek: wat kun je met embryo's doen en wat laten deze toe.

X: Bij die schaap-geit chimere komen in elk orgaan dus 2 typen cellen voor. Geldt dit nu ook voor geslachtscellen?

Zeilmaker: Dat is in een experimentele studie bij de muis inderdaad aangetoond. Daar zit echter weer een probleem aan vast. Die 2 embryo's waaruit de chimeer ontstaat kunnen van verschillend geslacht zijn zodat je in één individu een aanleg tot hermafroditisme hebt; in de praktijk blijkt dat het mannelijk geslacht gaat overheersen. Wanneer beide van hetzelfde geslacht zijn, dan kunnen in het ovarium 2 soorten eicellen aanwezig zijn, in de testis kunnen 2 soorten zaadcellen geproduceerd worden.

Taverne vraagt aan Zeilmaker om nadere uitleg over resistentie bij jonge embryo's tegen teratogenen.

Zeilmaker: Die vraag wordt natuurlijk gesteld ten aanzien van het werken met embryo's bij de mens met name; wat voor risico's daaraan verbonden zijn voor het zich ontwikkelend individu. Ook bij de farmacologen leeft de vraag of we die embryotest niet kunnen gebruiken als screening op mogelijk teratogene stoffen. Je kunt honderd embryo's (muizen) aan de test blootstellen en daar later individuen van maken en kijken of er afwijkingen zijn. Het blijkt dat het blootstellen van een muize-embryo na

de implantatie aan teratogene stoffen als mitomycine, op een bepaalde dag bijvoorbeeld bij 90% een hazelip geeft. Wanneer je dat twee dagen daarvoor geeft, dan werkt het niet. Met andere woorden die stoffen werken alleen tijdens de organogenese, dus na de implantatie. Het blootstellen van jonge embryo's aan die stoffen, kan wel leiden tot de dood van het embryo (toxisch), maar niet tot die teratologieën die men kent na de implantatie. Daar is uitvoerig werk aan verricht. Men komt tot de conclusie dat het embryo wel kan omkomen doordat bijvoorbeeld de pH niet goed is of dat een stof toxisch is, maar dat die schade zich niet manifesteert later in de ontwikkeling.

Metz: Kun je via technieken als clonering komen tot stabilisering van het heterosis effect? In de veefokkerij vinden zeer veel kruisingen plaats in de hoop via een heterosis-effect een superieure kwaliteit te verkrijgen.

Zeilmaker: Daar zie ik geen toekomstmogelijkheid voor om dat te fixeren. Het aantal nakomelingen van één bepaalde kruising blijft beperkt alhoewel je dat enigszins zou kunnen vergroten.

Van de Wiel: Clonering via kern diploïdisatie om tot exacte copieën te komen heeft alleen effect als je een homozygote ouder hebt; dat heb je juist niet als je uitgaat van een kruising.

Boender: Bij de cloneringstechnieken moet begonnen worden met het verwijderen van de zona pellucida, wat in dit geval in Engeland met behulp van microchirurgische methoden gebeurt. Is het ook te doen met enzymen bij deze dieren, bijvoorbeeld met hyaluronidase?

Van de Wiel: Dat weet ik niet, ik werk zelf niet aan clonering.

Zeilmaker: Nee. Er zijn soortverschillen. Het verwijderen van de zona pellucida gebeurt met pronase of trypsine. Hyaluronidase is nodig om de cumuluscellen te verwijderen. Pronase is niet in alle diersoorten actief en het hangt ook sterk van het stadium van het embryo af of de zona pellucida nog gevoelig is voor pronase.

Hoogenkamp: Bij het rund kan ik me dat nog wel voorstellen. De zona pellucida wordt met pronase niet geheel opgelost maar wordt wel 'brozer', langs mechanische weg wordt deze tenslotte verwijderd.

Boender: Ik ben namelijk met pronase bezig. Bij varkenscellen lukt het niet hiermee.

Van der Steen: Het lijkt er op dat je met embryo's veel kunt doen zonder dat dat schadelijke effecten heeft. Is het wel of niet overleven niet een grove methode van beoordelen?

Zeilmaker: Het gaat erom of je afwijkende nakomelingen krijgt na manipulatie met embryonen en die zijn eigenlijk nooit gevonden. Dus je vindt overleving of géén overleving. Als je kernen gaat transplanteren zoals Hoppe en Illmensee dat bij muizen hebben gedaan, dan gaat wanneer U of wij dat doen, wel 90% van de embryo's dood. Als je het goed doet ligt dat percentage lager.

De naald die in de kern gaat in de pronucleus zie je niet en toch overleven veel van deze zygoten en ontwikkelde zich tot muizen. Ik heb meer dan 100 van die muizen gemaakt en je verbaast je over het feit dat de cel dat alles kan verdragen.

Alink: Is er in verband met de vorige vraag, ook gekeken naar bijvoorbeeld genetische defecten, bepaalde enzymdeficiënties, mutagene veranderingen of andere lange termijn effecten?

Zeilmaker: Bij de muis is vastgesteld dat de voortplanting na afloop volkomen normaal is, dat er géén morfologische afwijkingen zijn. Ook zijn er nog transplantatieproeven gedaan.

Metz: Kunt U iets zeggen over (genetische) manipulatie van embryo's en eicellen.

Zeilmaker: Ik kan alleen wat speculeren. Ik liet U zien dat het mogelijk is om vreemd DNA met name in de muis te brengen. De transcriptie is nog een probleem, maar er zijn berichten in de literatuur dat het vertaald kan worden. Men zou zich kunnen voorstellen dat deze experimenten ook bij landbouwhuisdieren worden uitgevoerd. Je zou bijvoorbeeld het groeihormoon-gen, dat in gecloneerde vorm beschikbaar is (in handen van de industrie) in runderen kunnen inbrengen. De vraag is of dit tot expressie komt en aanleiding geeft tot een verhoogde groeihormoonproductie. Het lijkt me beter om dit eerst bij muizen uit te voeren. Er is een mogelijkheid dat je op deze manier een snellere groei krijgt; je hoeft het maar éénmaal te doen en het blijft permanent in het genoom aanwezig.

Garssen: Er is in Uw inleiding sprake geweest van 'anti-Y-serum', tegen welke antigene component is dit serum opgewekt?

Zeilmaker: Dat is bij muizen gebeurd. Men immuniseert een konijn tegen materiaal van een mannelijke muis. Het konijn maakt antilichamen tegen het Y-chromosoom, maar tegen al die andere honderden eiwitten eveneens. Daarna neutraliseert men dit anti-serum behalve dat antilichaam tegen het Y-chromosoom, met een homogenaat afkomstig van een vrouwelijke muis waarin al die honderden andere eiwitten ook voorkomen (want men beschikt

over ingeteelde muizen). Er is één laboratorium in de Verenigde Staten dat anti-Y-serum heeft, dat werkt tegen mannelijke cellen van de muis.

In hoeverre er kruisreactie is naar andere diersoorten weet ik niet. Dat zou wel essentieel zijn wanneer men zo'n antiserum bij het rund zou willen maken, want je kunt natuurlijk niet antistiereserum neutraliseren met een koeieserum want die twee zijn weer genetisch verschillend. Je moet dus identieke individuen hebben, die alleen van geslacht verschillen om serum te verkrijgen. Kruisreactie is, dacht ik, wel beschreven tussen muis en rat; of die tussen muis en rund aanwezig is, weet ik niet.

Van de Wiel: Je zou eigenlijk kopieën van volwassen dieren willen maken en dat kan eigenlijk nog niet voorzover ik weet. Je kunt, in theorie, wel kerntransplantatie doen van een kern van een somatische cel in een eicel. Is er al geëxperimenteerd met kernen van spermatogonia? Zouden die het soms beter doen?

Zeilmaker: Nee, bij amfibiën waar deze proeven veel gemakkelijker gaan, is het nog nooit gelukt om door één kerntransplantatie van een somatische cel een hybride te verkrijgen. Er moeten hertransplantaties plaatsvinden. Het enige vrij spectaculaire is dat men uit een kern van een darmcel van kikkerlarven een individu verkregen heeft. Ik zie niet in dat een en ander realiseerbaar is.

Timmerman: Met betrekking tot het vorige wil ik nog aanvullen dat in de darm erg veel ongedifferentieerde cellen voorkomen en dat in dit experiment slechts in 4% van de gevallen een embryo ontstond.

5. DE BETEKENIS VAN SOMATISCHE CELHYBRIDISATIE VOOR DE DIERLIJKE PRODUKTIE

MONOCLONALE ANTILICHAMEN: EEN BELANGRIJKE ONTWIKKELING IN DE SEROLOGIE

Dr. E. Egberts, J.J.M. van Groningen

Vakgroep Experimentele Diermorphologie en Celbiologie,
Landbouwhogeschool, Wageningen

Inleiding

Fusie van somatische cellen, alle cellen van een organisme behalve de geslachtscellen, is in de natuur geen onbekend verschijnsel. Meer dan 150 jaar geleden stelde de Duitse bioloog Müller vast dat sommige pathologische verschijnselen, zoals tumorvorming, bij dierlijke organismen gepaard gaan met het optreden van veelkernige cellen. Lang bleef het een punt van discussie of zulke veelkernige cellen ontstaan door het achterwege blijven van celdeling na kerndelingen, of door het versmelten van meerdere éénkernige cellen. Alleen in het laatste geval kan men strikt genomen van celfusie spreken. Inmiddels is gebleken dat beide mechanismen in de natuur aangetroffen worden. Zo is de vorming van veelkernige spiercellen door versmelting van een aantal myoblasten een goed voorbeeld van celfusie. Alhoewel ook de vorming van een zygote door celfusie tot stand komt, wordt dit verschijnsel echter niet gerekend tot het terrein van de somatische celhybridisatie.

Historie van somatische celhybridisatie

In het begin van deze eeuw slaagde Harrison (1) er in zenuwweefsel van een kikkervisje buiten het lichaam in leven te houden in een medium bestaande uit lymfevocht van de kikker. De daaropvolgende toepassing van dierlijk serum in het kweekmedium door Carrel (2) vormde een inleiding tot de standaardisatie van kweekmethodes voor dierlijke cellen. In het bijzonder is de bijdrage van de groep van Earle (3) hierbij van onschatbare waarde geweest. Zij toonden als eersten aan dat het mogelijk is om dierlijke cellen in grote hoeveelheden op glas als substraat of in suspensie te kweken. Bovendien waren zij in staat in celkweken uit één enkele cel nieuwe celcultures te ontwikkelen (cloneren). Momenteel vormt cel- en weefselkweek gezien de mogelijkheden tot het hanteren en bestuderen van cellen onder controleerbare omstandigheden een belangrijk com-

ponent van celbiologisch onderzoek aan eukaryotische cellen.

In 1960 toonden Barski et al. (4) aan dat ook fusie van somatische cellen in celkweek kan plaatsvinden. Okada (5) introduceerde het gebruik van geïnactiveerd virus om celfusies in vitro te induceren. Het jaar 1965 wordt wel beschouwd als een belangrijk jaar voor de ontwikkeling van de huidige somatische celhybridisatietechnieken. Harris en Watkins (6) publiceerden toen dat fusie in vitro ook optreedt tussen cellen afkomstig van verschillende diersoorten, waarbij zogenaamde heterokaryons worden gevormd. Tevens lieten Ephrussi en Weiss (7) zien dat dergelijke fusieprodukten na versmelting van de beide kernen kunnen overgaan in synkarions, welke in staat zijn zich in celkweek te vermeerderen.

Toepassingsgebieden van somatische celhybridisatie

Uit onderzoek met deze synkarions bleek al spoedig dat een verlies van chromosomen van één der beide partner-genomen in de hybride cel optreedt. Dit verlies blijkt groter, naarmate de verwantschap tussen de diersoorten, waarvan beide partnercellen afkomstig zijn, geringer is. Het fenomeen van chromosoomsegregatie in synkarions vormt de basis voor het opstellen van genenkaarten van dierlijke cellen in de somatische celgenetica (8, 9). Vooral in de humane geneeskunde is daardoor onze kennis van de achtergronden van erfelijke afwijkingen de laatste jaren aanzienlijk toegenomen, en zijn daarmee de mogelijkheden voor de prenatale diagnostiek van aangeboren afwijkingen vergroot.

In fundamenteel celbiologisch opzicht draagt de somatische celhybridisatie in belangrijke mate bij aan het onderzoek naar de regulatie van de genexpressie en het mechanisme(n) van celdifferentiatie. Afhankelijk van de soort en de toestand van de bij celhybridisatie gebruikte cellen, en de aard van de genetische eigenschap welke bestudeerd wordt, kan de expressie van een gen van één der partnercellen in een synkarion aanwezig blijven (coëxpressie of codominantie) of onderdrukt worden (extinctie). Ook is het mogelijk dat een eigenschap die in de ouderlijke cel niet aantoonbaar was, in de nieuwe situatie wel tot uiting komt (activatie). Algemene kenmerken van cellen, zoals die welke noodzakelijk zijn voor het voortbestaan van de cel, vertonen vaak het verschijnsel coëxpressie. De expressie van kenmerken welke karakteristiek zijn voor gedifferentieerde cellen is daarentegen veelal onderhevig aan extinctie. Dit laatste komt overeen met gegevens die erop wijzen dat selectie in celkweek op goede

groei-eigenschappen van de cellen gepaard gaat met een neiging tot verlies van gedifferentieerde kenmerken, met andere woorden, proliferatie in vitro en gedifferentieerde kenmerken sluiten elkaar uit. Dit is een groot probleem bij de biotechnologische toepassing van eukaryotische celkweken voor het verkrijgen van specifieke genprodukten zoals bijvoorbeeld hormonen en immunoglobulines. Vanuit dit oogpunt ligt een toepassing van recombinant DNA-technieken voor de produktie van zulke stoffen door bacteriën meer voor de hand. Echter, een groot aantal van deze stoffen is voor hun biologische activiteit aangewezen op de aanwezigheid van koolhydraatzijketens. In prokaryote systemen vindt glycosylatie, de koppeling van deze koolhydraatzijketens aan eiwitten, niet plaats. Het is echter mogelijk dat de ontwikkeling van eukaryote gastheer-vector systemen hier een uitkomst kan bieden. Een ander probleem bij produktie door gerecombineerde bacteriën betreft de mogelijke verontreiniging van het eindprodukt met endotoxines. Derhalve blijft het onderzoek naar de mogelijkheden van somatische celhybridisatie voor een biotechnologische toepassing, waarvoor zeker perspectieven aanwezig zijn, van belang. De aard en achtergrond van de beide partnercellen in een celfusie lijkt namelijk een belangrijke rol te spelen bij de bepaling van het lot van een gedifferentieerd kenmerk in een eventuele celhybride. Naarmate de morfologische en functionele eigenschappen van de gebruikte celtypes meer overeenkomen, wordt de kans op extinctie van een gedifferentieerde eigenschap kleiner. Een goed voorbeeld hiervan is de produktie van monoclonale antilichamen door hybridoma's.

Hybridoma's en monoclonale antilichamen

Behoudens enkele uitzonderingen waarbij plasmacellen of hun voorlopers met behulp van virussen getransformeerd konden worden tot permanente cellijnen (10, 11, 12), zijn de voor de synthese van immunoglobuline verantwoordelijke plasmacellen buiten het organisme geen lang leven beschoren. Uit een groot aantal experimenten in het begin van de jaren zeventig kwam naar voren dat, ofschoon in een synkarion extinctie van de synthese van immunoglobuline zeer vaak optreedt, een aantal combinaties van ouderlijke celtypen aanleiding geven tot coëxpressie van dit gedifferentieerde kenmerk. Hierop voortbouwend slaagden Köhler en Milstein (13, 14) erin door fusie van een immunoglobuline producerende, in celkweek goed prolifererende, muis plasmacytomacel met een door antigeen

geactiveerde B-lymfoblast afkomstig van een geïmmuniseerde muis, een celhybride (hybridoma) te verkrijgen. Deze kon enerzijds onbeperkt in celweek aangehouden worden, en produceerde anderzijds een antilichaam dat specifiek was voor het gebruikte antigeen (monoclonaal antilichaam). Deze methode, die de mogelijkheid biedt om antilichamen met een absolute specificiteit en constante titer te verkrijgen tegen elk gewenst antigeen, werd in korte tijd veelvuldig nagevolgd. Aanvankelijk werd de hybridomatechniek voornamelijk beoefend in laboratoria waar immunologische vraagstellingen bestudeerd werden, en waar men daarnaast beschikte over faciliteiten voor dierlijke celweek (zie referentie 15). Naast diverse laboratoria ^{x)} in Nederland werkzaam op het gebied van de humane geneeskunde, kan in de landbouwkundige sector als voorbeeld worden genoemd de Sectie Celbiologie van de Vakgroep Experimentele Diermorphologie en Celbiologie aan de Landbouwhogeschool, Wageningen (16, 17, 18, 19). Spoedig kreeg men echter oog voor de veel bredere mogelijkheden in de fundamentele (zie referentie 20) en toegepaste (zie referentie 21) serologische analyse en diagnostiek, en raakten ook anderen dan immunologen en celbiologen geïnteresseerd in de hybridomatechniek.

Voordelen van monoclonale antilichamen

Monoclonale antilichamen kunnen in een aantal opzichten aan de beperkingen van het gebruik van op 'conventionele' wijze verkregen antisera tegemoet komen. Hiervan zullen in het kort enkele worden besproken.

1. Specificiteit en kruisreactiviteit

De specificiteit van monoclonale antilichamen voor één determinant, een kleinste mogelijke eenheid van een antigeen waarmee een immunoglobuline molecuul kan reageren, sluit kruisreactiviteit tegen andere antigenen uit, tenzij deze beschikken over precies dezelfde determinant waartegen het monoclonaal antilichaam gericht is. In dat geval echter kan men alsnog onderscheid maken tussen zulke antigenen, en de overeenkomsten en verschillen ondubbelzinnig vaststellen, als men over meer monoclonale

x) Tot deze laboratoria behoren:

- Afdeling Celbiologie en Genetica, Erasmus Universiteit, Rotterdam
- Afdeling Immunologie, Antonie van Leeuwenhoek-Ziekenhuis, Amsterdam
- Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusiedienst, Amsterdam
- Instituut voor Experimentele Gerontologie TNO, Rijswijk
- Laboratorium voor Nierziekten, Katholieke Universiteit, Nijmegen
- Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven

antilichamen beschikt gericht tegen determinanten waarin de antigenen verschillen. Aangezien conventionele antisera bestaan uit een mengsel van verschillende immunoglobulines, elk gericht tegen één der determinanten van een antigeen, en dit mengsel niet in de afzonderlijke componenten is te scheiden, zullen deze antisera bij overeenkomst van een deel der antigene determinanten geen onderscheid tussen antigenen kunnen maken. Voorbeelden van zulke antigenen zijn nauw verwante soorten van virussen, bacteriën en parasieten. Ook complexe cellulaire structuren zoals de weefselantigenen, bloedgroepfactoren, en de op immunoglobulines en verwante moleculen gebaseerde celreceptoren, die opgebouwd zijn uit polymorfe (unieke) en algemene elementen, zijn serologisch lastig te definiëren.

2. Constante eigenschappen

Niet alleen van proefdier tot proefdier, maar zelfs van immunisatie tot immunisatie van één en hetzelfde individu kan de kwaliteit van een 'conventioneel' verkregen antiserum sterk variëren. De in vitro kweek van hybridoma's biedt daarentegen de mogelijkheid onder gestandaardiseerde omstandigheden serologische reagentia te produceren met een hoge en weinig variabele concentratie aan antilichaam en een uniforme affiniteit voor het antigeen. Een bijkomend voordeel kan een besparing van het gebruik van proefdieren zijn.

Toepassingsgebieden van monoclonale antilichamen

Op grond van de beschreven eigenschappen van monoclonale antilichamen kunnen momenteel de volgende mogelijkheden voor toepassing in onderzoek en praktijk van de plantaardige en dierlijke produktie worden aangegeven:

1. Immunodiagnostiek

Zoals reeds in het voorafgaande aangeduid kan de serologische detectie met monoclonale antilichamen van bijvoorbeeld infectieuze organismen, verontreinigingen, hormonen en hormoonderivaten en pathologische verschijnselen, tot ontwikkeling gebracht, respectievelijk verfijnd worden. Daarnaast kunnen monoclonale antilichamen een rol spelen in het fundamentele op landbouwkundige toepassing gerichte onderzoek waarbij identificatie van biologische structuren of macromoleculen, in het bijzonder wanneer ze in een complex verband voorkomen, tot nu toe een belemmering is gebleken. Voorbeelden hiervan zijn het genetisch onderzoek op het terrein van ziekteresistentie en onderzoek naar het functioneren van het

immuunsysteem van landbouwhuisdieren. Uit een dergelijk onderzoek kan een toepassing resulteren van monoclonale antilichamen op het gebied van bloedgroep- en/of weefselantigeen bepalingen bij landbouwhuisdieren, terwijl een gedetailleerde kennis van de organisatie en werking van het immuunsysteem ons in staat stelt effectieve ziektepreventiemaatregelen te treffen.

2. Immunotherapie

Van de specifieke herkenning door monoclonale antilichamen van een antigeen kan ook gebruik gemaakt worden om structuren, waarvan zo'n antigeen deel uitmaakt, in vivo door middel van passieve immunisatie uit te schakelen. Zo is de incidentie van leukemische tumoren bij muizen sterk verlaagd wanneer deze dieren behandeld worden met een muize monoclonaal antilichaam specifiek voor een tumorcel-eigen antigeen (22). Blythman et al. (23) toonden aan dat de activiteit van zo'n monoclonaal antilichaam onafhankelijk gemaakt kan worden van de andere componenten van het afweersysteem van het betrokken individu door het antilichaam te koppelen aan een cytotoxische stof. Deze elegante methode ter bestrijding van pathologische celtypes in vivo staat ook wel bekend als de 'target drug therapy' of 'guided missile-technique'. Het spreekt vanzelf dat dergelijke therapeutische mogelijkheden vooral met het oogmerk van klinische toepassing in de humane geneeskunde ontwikkeld worden. Vanuit dit gezichtspunt is de ontwikkeling van soorteigen monoclonale antilichamen ter voorkoming van een afweerreactie tegen het antilichaam bij meervoudige passieve immunisatie van groot belang. De eerste publicaties welke de ontwikkeling beschrijven van mens monoclonale antilichamen uit fusies van humane tumorcellen met menselijke lymfocyten (24, 25) zijn daarom een hoopvol teken.

Men kan zich afvragen of een soortgelijke ontwikkeling van homologe hybridoma's voor de veterinaire geneeskunde onderzoektechnisch haalbaar en voor de praktijk zinvol is. De incidentie van plasmaceltumoren, de bron voor de isolatie van een cellijn van soorteigen myelomacellen, is bij de meeste landbouwhuisdieren, afgezien van pluimvee, namelijk zeer laag. Tevens zijn ten opzichte van de economische waarde van het individu de kosten welke gepaard gaan met de ontwikkeling, produktie en klinische toepassing van monoclonale antilichamen tot nu toe zeer hoog. Tenslotte kan in dit kader vermeld worden dat onderzoek bij landbouwhuisdieren naar de produktie van homologe antilichamen via interspecifieke hybridoma's,

zoals die gevormd in een fusie tussen muis myelomacellen en schapelymfocyten, tot nu toe, in tegenstelling tot bij mens en rat, teleurstellende resultaten heeft opgeleverd (E.M. Tucker, pers. mededeling).

3. Scheidings- en zuiveringstechnieken

Ook bij de zuivering van geringe hoeveelheden van een stof uit een complex mengsel kunnen monoclonale antilichamen de helpende hand bieden, door bewerkelijke en tijdrovende, en dientengevolge kostbare scheidingsprocessen aanzienlijk te verbeteren. Een voorbeeld is de bereiding van interferon, een nu op semi-industriële schaal door lymfoblastoïde cellen in kweek (en misschien binnenkort eveneens door recombinante bacteriën) geproduceerde stof die lastig in voldoende hoeveelheden in zuivere vorm is te isoleren. Door Secher en Burke is een monoclonaal antilichaam ontwikkeld tegen interferon. Door dit antilichaam te koppelen aan een drager kon een immuno-adsorptiekolom geconstrueerd worden waarmee in één enkele chromatografiestap een 5000-voudige verrijking van een interferon preparaat werd verkregen (26). Op vrijwel identieke wijze is het mogelijk een complex mengsel van stoffen door middel van een aantal achter elkaar geschakelde immuno-adsorptiekolommen, die elk een monoclonaal antilichaam bevatten gericht tegen één der componenten van het mengsel, uiteen te rafelen in de afzonderlijke onderdelen. Deze methode staat bekend als de cascademethode. Het is hierbij van grote waarde dat voor de toepassing van een cascademethode geen der componenten van het mengsel geïdentificeerd en/of in zuivere vorm voorhanden behoeft te zijn.

Conclusies

Uit het voorafgaande blijkt dat de ontwikkeling van hybridoma's als een bron van monospecifieke antilichamen zich in korte tijd een belangrijke plaats heeft verworven in fundamenteel en toegepast wetenschappelijk onderzoek. Het zwaartepunt heeft daarbij tot nu toe gelegen op de humane geneeskunde, waar ook het eerst resultaten van een praktische klinische toepassing te verwachten zijn.

Bij de plantaardige en dierlijke produktie kunnen monoclonale antilichamen een belangrijke rol gaan spelen in het op toepassing gerichte onderzoek en in de serologische diagnostiek. Een therapeutisch gebruik lijkt voorshands minder aannemelijk. In hoeverre cellen van plant en dier door middel van somatische celhybridisatie aangepast kunnen worden voor de in vitro produktie van andere belangwekkende stoffen dan immunoglobulines, zoals bijvoorbeeld hormonen, is momenteel niet te voorspellen.

Literatuur

1. Harrison, R.G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. exp. Biol.* 4, 140.
2. Carrel, A. (1912). The permanent life of tissue outside of the organism. *J. exp. Med.* 15, 615.
3. Earle, W.R. (1948). Tissue culture. In: *Laboratory Technique in Biology and Medicine*. E.V. Cowdry (Ed.), Baltimore: Williams & Wilkins, 2nd Ed.
4. Barski, G., Sorieul, S. and Cornefert, F. (1961). 'Hybrid' cell types in combined cultures of two different mammalian cell strains. *J. Natl.Cancer Inst.* 26, 1269.
5. Okada, Y. (1962). Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell Res.* 26, 98.
6. Harris, H. and Watkins, J.F. (1965). Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature (Lond.)* 205, 640.
7. Ephrussi, B. and Weiss, M.C. (1965). Interspecific hybridization of somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 1040.
8. McKusick, V.A. (1980). The anatomy of the human genome. *J. Heredity* 71, 370.
9. McKusick, V.A. (1982). The human genome through the eyes of a clinical geneticist. *Cytogenet. Cell Genet.* 32, 7.
10. Strosberg, A.D., Collins, J.J., Black, P.H., Malamud, D., Wilbert, S., Bloch, K.J. and Haber, E. (1974). Transformation by simian virus 40 of spleen cells from a hyperimmune rabbit: demonstration of production of specific antibody to the immunizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 263.
11. Zurawski, V.R., Jr., Haber, E. and Black, P.H. (1978). Production of antibody to tetanus toxoid by continuous human lymphoblastoid cell lines. *Science* 199, 1439.
12. Steinitz, M., Klein, G., Koskimics, S. and Hakel, O. (1977). EB virus induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature (Lond.)* 269, 420.
13. Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond.)* 256, 495.
14. Köhler, G. and Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6, 511.

15. Melchers, F., Potter, M. and Warner, N. (Eds.) (1979). Lymphocyte Hybridomas. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 81, Heidelberg: Springer Verlag.
16. Van Muiswinkel, W.B. and Rijkers, G.T. (1982). Immuunsystemen in het dierenrijk. Natuur en Techniek. 50, 676.
17. Egberts, E. and Haaijman, J.J. (1982). Monoklonale antistoffen. Een nieuwe ontwikkeling in de biotechnologie. Natuur en Techniek. 50, 54.
18. Egberts, E., Van Groningen, J.J.M. and Van Muiswinkel, W.B. (1982). The immune system of cyprinid fish. Monoclonal antibodies against carp thymocytes. Develop. Comp. Immunol. Suppl. 2, 217.
19. Secombes, C.J., Van Groningen, J.J.M. and Egberts, E. (1983). Separation of lymphocyte subpopulations in carp Cyprinus carpio L. by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies. Immunology, in press.
20. Kennett, R.H., McKearn, T.J. and Bechtol, K.B. (Eds.) (1980). Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. New York: Plenum Press.
21. Albertini, A. and Ekins, R. (Eds.) (1981). Monoclonal Antibodies and Developments in Immunoassay. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
22. Bernstein, I.D., Tam, M.R. and Nowinski, R.C. (1980). Mouse leukemia: therapy with monoclonal antibodies against a thymus differentiation antigen. Science 207, 68.
23. Blythman, H.E., Casellas, P., Gros, O., Gros, P., Jansen, F.K., Paoluci, F., Pau, B. and Vidal, H. (1981). Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. Nature (Lond.) 290, 145.
24. Olsson, L. and Kaplan, H.S. (1980). Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5429.
25. Croce, C.M., Linnenbach, A., Hall, W., Steplewski, Z. and Koprowski, H. (1980). Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus. Nature (Lond.) 288, 488.
26. Secher, D.S. and Burke, D.C. (1980). A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. Nature (Lond.) 285, 446.

6. TOEPASSING VAN HYBRIDOMA'S ALS BRON VAN MONOCLONALE ANTILICHAMEN IN DE DIERLIJKE PRODUKTIESFEER

Ir. P. Booman

Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek 'Schoonoord', Zeist

Inleiding

Tot voor kort kon men alleen antilichamen tegen een antigeen verkrijgen door het antigeen in zijn meest zuivere vorm in te spuiten bij een proefdier, meestal een konijn. Een dergelijke immunisatie heeft veelal de vorming van antilichamen in het dier ten gevolge, die dan uit het serum kunnen worden geïsoleerd.

Deze conventionele methode van antistofproductie heeft echter een aantal nadelen. Het verkregen antiserum bevat namelijk naast de antistoffen die specifiek gericht zijn tegen het antigeen, ook zogenaamde kruisreagerende antistoffen. Men moet zich daarbij voorstellen dat aan de oppervlakte van een antigeen verschillende structuren of antigenen determinanten voorkomen. Deze determinanten behoeven niet altijd specifiek voor het betreffende antigeen te zijn. Zo kunnen sommige determinanten ook op het oppervlak van lichaamseigen stoffen voorkomen. Een conventioneel verkregen antiserum bevat antilichamen tegen alle determinanten die op het antigeen voorkomen. Naast antilichamen tegen antigeen-specifieke determinanten bevat het antiserum dus ook antilichamen tegen niet-specifieke determinanten.

Een ander probleem met conventionele antisera is de reproduceerbaarheid. Geen enkel dier geeft een identiek antiserum na inspuiten met hetzelfde antigeen. Als éénmaal een goed antiserum is verkregen, is het moeilijk een dergelijk antiserum opnieuw te produceren.

Monoclonale antilichamen

Met het onderzoek van Köhler en Milstein (1975) vond een doorbraak plaats in de productie van antistoffen. Zij fuseerden antilichaamvormende cellen uit de milt van de muis in vitro met muizen tumorcellen, myelomacellen genaamd. De aldus ontstane hybride cellen (hybridoma's) behielden de twee belangrijkste eigenschappen van de beide oudercellen: de antistofvorming werd in de samengesmolten cel voortgezet en de eigenschap tot voortdurende deling, afkomstig van de tumorcel, bleef behouden. Deze combinatie van eigenschappen maakte het mogelijk in vitro een steeds doorgroeiende

cellijn op te kweken die voortdurend antistoffen bleef afscheiden in het weefselkweekmedium.

Door de antilichaamvormende cellen te cloneren - dat is een methode waarbij cellen vanuit één oudercel worden opgekweekt - werd een monoclonaal antiserum verkregen waarbij de structuur van alle antistofmoleculen volkomen identiek is.

In tegenstelling tot conventionele antisera zijn monoclonale antilichamen gericht tegen slechts één antigene determinant. Kruisreactiviteit met andere antigenen treedt slechts op als deze determinant daar eveneens op voorkomt. Naast hun specificiteit hebben monoclonale antisera het grote voordeel dat zij in onbeperkte hoeveelheden gemaakt kunnen worden bij constante kwaliteit en eigenschappen. Bovendien kunnen de hybride cellen jarenlang in vloeibare stikstof bewaard worden en kan op elk gewenst moment de antilichaamproductie weer ter hand worden genomen.

Het IVO-onderzoek

In 1982 is op het IVO aangevangen met de produktie van monoclonale antilichamen via de hybridomatechniek om in de dierlijke produktiesfeer in de behoefte aan antiserum te kunnen voorzien.

Door hun specificiteit, standaardiseerbaarheid en produktietechnische voordelen is het gebruik van monoclonale antilichamen bijzonder aantrekkelijk wanneer het gaat om immunologische routinebepalingen in grote aantallen met een absolute herhaalbaarheid over meerdere jaren.

In dit verband zouden monoclonale antilichamen bijvoorbeeld toegepast kunnen worden in de volgende op het IVO lopende onderzoekactiviteiten.

- De melk-progesterontest.

Lange tussenkalftijden bij het rund kunnen veroorzaakt worden door het feit dat de tochtigheid niet, c.q. foutief, wordt waargenomen. Via bepaling van het progesterongehalte in een melkmonster, genomen op het moment van inseminatie, kan dit worden gecontroleerd. Tevens is het mogelijk drie weken na de inseminatie vast te stellen of het dier al dan niet drachtig is geworden. De resultaten van de onderzoeken zijn zodanig dat een meer grootschalige en routinematige toepassing van de melk-progesterontest binnenkort in ons land lijkt te gaan plaatsvinden. De ontwikkeling van een niet-radio-actieve bepalingsmethode, de enzym-immuno-assay (EIA), biedt daarbij veel perspectieven.

In het kader van een bilateraal project voor ontwikkelingssamenwerking

wordt voorts gewerkt aan de invoering van de melk-progesterontest in Thailand, in dit geval bij de waterbuffel.

- Drachtigheidsdiagnose bij varkens.

Het gehalte aan oestransulfaat in het bloed van drachtige varkens neemt tussen de 16e en 40e dag sterk toe, terwijl het niveau bij een cyclisch dier daarentegen vrij constant blijft. Opdat de resultaten in verband met een eventuele herinseminatie binnen een dag ter beschikking kunnen zijn, werd een EIA voor oestransulfaat ontwikkeld.

- Aantonen van beregeurcomponent in de slachtlijn

Niet alleen vanuit het oogpunt van welzijn maar ook uit economische overwegingen verdient het de voorkeur beren in plaats van borgen te mesten. Het optreden van geslachtsgeur bij sommige beren beperkt echter de verwerkingsmogelijkheden van het vlees van dergelijke dieren. Om beren met geslachtsgeur te kunnen herkennen is eveneens een EIA beschikbaar voor het objectief meten van androstenon, de belangrijkste component van beregeur.

Voor routinematige toepassing van genoemde analyses in de praktijk zijn grote hoeveelheden antilichamen nodig. Bovendien kunnen de tests door gebruik van monoclonale antilichamen beter gestandaardiseerd worden tussen verschillende laboratoria.

Verdere perspectieven in de dierlijke productie

Toepassing van monoclonale antilichamen op de hiervoor genoemde terreinen van het huidige IVO-onderzoek onderstreept het belang van hybridoma's voor de diagnostiek in de dierlijke productie. In dit kader bieden monoclonale antilichamen perspectieven bij onder meer:

- Screeningsprogramma's op . hormonen
 - . anabolica
 - . enzymen
 - . antibiotica/chemotherapeutica
 - . toxische residuen en contaminanten
- Standaardisatieprogramma's voor de bepaling van hormonen en andere stoffen van dierlijke oorsprong (EIA/RIA).

Het streven naar standaardisatie wordt belichaamd in de plannen tot het oprichten van een Europees Hormonen Centrum. Hoewel deze plannen tot nu toe uitsluitend betrekking hebben op standaardisatie van hormoonpreparaten, lijkt de standaardisatie van antisera tegen deze hormoonprepa-

raten een volgende logische stap.

- Vroegtijdige screening op genetisch (on)gewenste gebruikseigenschappen. Met behulp van monoclonale antilichamen tegen een geslachtsspecifiek antigeen op de oppervlakte-membraan van het Y-chromosoom dragende cellen, het H-Y antigeen, kunnen bijvoorbeeld runderembryo's vóór transplantatie in geslacht onderscheiden worden. Hierdoor is invloed uit te oefenen op de geslachtsverhoudingen in de dierlijke produktie.

- Klinische diagnostiek . virologie

. bacteriologie

. parasitologie

. protozoölogie

- Bereiding van antilichamen tegen onzuivere of zelfs onbekende antigenen.

Naast de diagnostiek zijn binnen de veeteelt talrijke toepassingen van hybridoma's mogelijk. Zonder naar enige volledigheid te willen streven, kunnen de volgende voorbeelden genoemd worden:

- Genetisch onderzoek ziekteresistentie

Ontwikkelingen in de veehouderij resulterende in een verhoogde infectiedruk, doen de belangstelling voor het genetisch bepaald zijn van de weerstand toenemen. Bij het rund en het varken is een begin gemaakt met het onderzoek naar de serotypen van de witte bloedcellen. Specifieke antisera verkregen door middel van hybridoma's zouden dit onderzoek aanzienlijk kunnen versnellen.

- Onderzoek naar werkingsmechanismen van bijvoorbeeld receptoren en enzymen. Monoclonale antilichamen tegen receptoren kunnen gebruikt worden bij het isoleren en karakteriseren van deze receptoren; specifieke antilichamen tegen enzymen en andere eiwitten voor studie naar cel- en weefsellocatie van het eiwit.

- Zuivering van biologische stoffen die anderszins moeilijk te verkrijgen zijn.

Bijvoorbeeld zuivering van het antiviraal werkende interferon. Wanneer eenmaal monoclonale antilichamen tegen een bepaald antigeen beschikbaar zijn, kan dit antigeen via affiniteitschromatografie op grote schaal gezuiverd worden.

- Koppeling van chemotherapeutica, cytotoxische stoffen of radio-actief label aan een specifiek antilichaam.

Cytotoxische stoffen, verpakt in liposomen, kunnen bijvoorbeeld gekoppeld worden aan monoclonale antistoffen. Na injectie van de antilichamen in de

bloedbaan zouden deze hun weg weten te vinden naar het antigeen en specifiek hiermee contact maken. De cytotoxische stoffen kunnen daarna worden opgenomen.

Homologe hybridoma's

Tot nu toe zijn monoclonale antilichamen tegen een bepaald antigeen alleen te bereiden door muizen - of ratten myelomacellen te fuseren met de tegen het antigeen gesensibiliseerde antilichaamvormende cellen van muizen of ratten. Vooral bij therapeutische toepassing (passieve immunisatie) zou het de voorkeur verdienen gebruik te maken van antilichamen van dezelfde soort omdat antilichamen van een andere species bij herhaalde toepassing tot afweerreacties kunnen leiden. Gebruik van homologe hybridoma's zou ook bij het verklarend onderzoek naar de werking van hormonen, receptoren, neurotransmitters en dergelijke zijn te prefereren. Het immunologisch neutraliseren van perifeer circulerende hormonen is bijvoorbeeld één van de wegen waarlangs men de fysiologische betekenis van bepaalde hormonale evenwichten kan achterhalen.

Vooral in de humane sector is men van meet af aan gebrand geweest op de ontwikkeling van humaan-humaan hybridoma's. Bij gebrek aan een geschikte humane myelomacellijn richtte de aandacht zich in eerste instantie op de produktie van 'interspecies' hybridoma's, waarbij antilichaamvormende cellen van geïmmuniseerde menselijke donoren werden gefuseerd met muizen myelomacellen. De fusies waren succesvol maar de stabiliteit van deze hybridoma's bleek een probleem te zijn. Door verlies aan genetische informatie waren deze cellijnen slechts in staat om gedurende korte tijd en in geringe hoeveelheden antilichamen te produceren. Thans zijn enkele humane myelomacellijnen ter beschikking gekomen, waardoor deze problemen in de nabije toekomst opgelost kunnen zijn.

Naar analogie van de humane hybridoma's zal op het Instituut voor Vee- en teeltkundig Onderzoek de mogelijkheid bestudeerd worden te komen tot runder- en varkenshybridoma's. De mogelijkheden van dergelijke homologe hybridoma's bieden binnen de dierlijke produktiesfeer bijzonder veel perspectief.

Literatuur

Köhler, G. and Milstein, L. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Kennett, R.H., T.J. McKearn and K.B. Bechtol. Monoclonal antibodies; Hybridomas: a new dimension in biological analyses. Plenum Press, New York and London (1980).

Fellows, R.E. and G.S. Eisenbarth. Monoclonal antibodies in endocrine research. Raven Press, New York (1981).

Albertini, A. and R. Ekins. Monoclonal antibodies and developments in immunoassay. Elsevier, North-Holland (1981).

Discussie 'blok' 2

Garssen: Mijn vraag slaat niet geheel op de ontwikkeling van hybridoma's, maar je zou je kunnen voorstellen dat bijvoorbeeld hypofysecellen die groeihormonen produceren gefuseerd worden met kankerachtige cellen eveneens uit hypofyseweefsel afkomstig. In hoeverre zijn de probleemstellingen hierbij vergelijkbaar met die bij ontwikkeling van hybridoma's? Werkt men ook hieraan?

Egberts: Daar wordt zeker naar gestreefd. Het produceren van hybridoma's is een gespecialiseerd voorbeeld van een algemeen probleem, namelijk het behoud van gedifferentieerde kenmerken in een kweekbare cel. Bij de ontwikkeling van hybridoma's is het min of meer een gelukkige greep geweest om uit te gaan van de plasmacytoma cellijn X 63, hoewel er veel meer bekend zijn bij de muis. We hebben niet helemaal inzicht in wat nu precies bij die combinatie een rol speelt, afgezien van de algemene regel dat de ouderlijke cellen nauwe functionele verwantschap moeten vertonen. Ik denk dat dat ook voor alle andere combinaties (bijvoorbeeld hypofysecellen) opgeld zal doen. Dit betekent in feite dat je een grote hoeveelheid verschillende kweekbare hypofyse tumorcellijnen moet hebben, wil je met zo'n onderzoek starten. Ik denk dat daar de bottleneck zit. In dezelfde zin zie ik dit ook voor het maken van eventuele intra-species (binnen de soort) hybridoma's (runderen en schapen). Hoe kom je bijvoorbeeld aan een grote hoeveelheid verschillende kweekbare myeloma tumorcellijnen van het rund?

Garssen: Is dat te induceren?

Egberts: Bij muizen zijn die te induceren. Het in kweek brengen is echter een heel probleem.

Sachs (Israël, 1969) is het voor het eerst gelukt om 2 à 3 myelomalijnen van de muis in kweek te brengen. Hij trok de publikatie echter in omdat herhaling van het experiment niet lukte. Twee jaar daarna is het aan Horibata en Harris ook gelukt en deze konden de experimenten tevens herhalen. De inductie is ook iets wat niet 100% slagingskans heeft. Je hebt daar dus nogal wat proefdieren voor nodig. Bij rat en muis ligt de situatie gunstig. Menselijke tumorcellijnen zijn natuurlijk ook weer wat gemakkelijker te krijgen dankzij de sterke ontwikkeling van de tumor-diagnostiek en de operatieve methodes. Maar ik zie dat bij de veeteelt moeilijker liggen.

Metz: Kan dat ook een kwestie zijn dat bij de veehouderij het trial en error systeem minder ontwikkeld is? Komt het omdat er minder mee ge-experimenteerd is?

Egberts: Je experimentele ruimte is kleiner wat betreft aantallen dieren. Je hebt al snel 1000 - 2000 muizen in een kleine ruimte en je verkrijgt ze ook wat gemakkelijker ten behoeve van je onderzoek dan koeien.

Metz: De interferonisolering is als voorbeeld besproken. Het binden van interferon aan een antilichaam, en wat vervolgens?

Egberts: Onder bepaalde condities is die binding weer te verbreken zonder dat dit schade doet aan de werking van het antilichaam. Dus zo dat de werking van de kolom bewaard blijft en het interferon onbeschadigd uit de kolom komt.

Metz: Geldt dit voor talloze antilichaam-antigeen systemen?

Egberts: Ja, het is alleen een kwestie van uitzoeken van goede condities.

Seinhorst: In hoeverre is de produktie van antilichamen via bacteriën, DNA-manipulatie dus, concurrerend voor u? Biedt dit niet meer mogelijkheden en is het niet gemakkelijker?

Egberts: In principe wel. De recombinant DNA techniek kan zeker dezelfde of meer mogelijkheden bieden. Tot nu toe heeft die één nadeel: glycosylatie van het produkt treedt niet op en immunoglobulinen zijn wat betreft hun activiteit sterk gebonden aan koolhydraatzijketens. Dit is een absolute voorwaarde voor hun werking. Het betekent dat je dus wèl de genetische capaciteit van immunoglobulinesynthese kunt inbrengen in bacteriën, maar dat wat je eruit krijgt geen echte immunoglobulines zijn, maar ketens zonder koolhydraatzijketens, ergo: geen werking.

Metz: Egberts sprak op een zeker moment over activiteitsverlies bij het ouder worden van hybridoma's. Is dat een normaal voorkomend iets?

Egberts: Dat is niet een echt activiteitsverlies van een hybridoma, het is verlies van hybridoma's.

Direct na de fusie zijn alle hybridoma's instabiel, pas na verloop van tijd worden ze stabiel. Die stabiliteit gaat gepaard met celdood, en met verlies van immunoglobulinesynthese òf met behoud van deze synthese in de overblijvende prolifererende cellen. Als ze éénmaal in die zin stabiel zijn, is het probleem uit de wereld.

Metz: Zit u in een fasering van aantallen dagen?

Egberts: Pakweg 3 à 4 maanden.

Dekkers: In de Verenigde Staten en Engeland schieten de firma's die

hybridoma's produceren als paddestoelen uit de grond. Vooral omdat die als hulpmiddel voor de basisresearch belangrijke implicaties kunnen hebben. Ik vraag me af of men hier in Nederland voldoende op de hoogte is van de mogelijkheden die er in dit opzicht zijn (vergelijk de gebieden die op de sheet getoond werden). Hoe schat u dat in?

Egberts: De enige is bij mijn weten Organon (Akzo) die in zijn zwangerschapskit, die op de markt is voor het vaststellen van menselijke zwangerschap, monoclonaal antilichaam gericht tegen hCG, verwerkt. Het probleem dat geldt voor het maken van alle monoclonale antilichamen tegen hormonen is, zoals men mij bij Organon ook verteld heeft, een lage affiniteit van het antigeen. Men zit te springen om een goede test, waarmee vroegtijdig goede affiniteit vastgesteld kan worden. Het verkrijgen van hybridoma's is geen probleem, wèl het uitsélectioneren van goede.

Inderdaad zijn er in het buitenland wat meer firma's die hierop inspringen. Dit heeft, denk ik, te maken met economische omstandigheden; landen als de Verenigde Staten verschillen in hun actieve research van Nederland. Het is ook opmerkelijk dat, hoewel de techniek ontwikkeld is in Engeland door Köhler en Milstein (Medical Research Council), deze daarop geen patent hebben aangevraagd. De techniek is de hele wereld doorgezworven en vervolgens hebben Amerikanen alsnog na 4 jaar geprobeerd op bepaalde delen het patent in handen te krijgen. Met andere woorden, een heel duidelijk verschil in mentaliteit tussen Europese en Amerikaanse wetenschappers en de connecties die ze eventueel hebben met de industrie.

Dekkers: Ik vroeg me vooral af of de geweldige mogelijkheden voor basisresearch die monoclonale antilichamen bieden, voldoende onderkend worden in Nederland op dit moment.

Egberts: Ik dacht het wel. Gezien de ontwikkelingen van de techniek, denk ik, voornamelijk op het gebied van de humane geneeskunde.

Dekkers: Ik denk aan basiswetenschappen als bacteriologie, virologie en parasitologie.

Egberts: Ik denk dat je goed in de gaten moet houden wat je ermee wint ten opzichte van de oude situatie. Ik kan me voorstellen dat je er niet zoveel mee opschiet als kruisreactiviteit in je testsysteem geen probleem is, als reproduceerbaarheid maar een miniem probleem is. Dan vraag ik me af of het de moeite waard is om er zoveel geld en moeite in te steken als je het ook door middel van proefdieren-antiserum kunt produceren in voldoende hoeveelheid. Het is een afwegen van kosten en baten.

Dekkers: In Engeland is ook recentelijk weer een firma op dit gebied gestart; er moet dan toch wel een uitgebreid terrein liggen.

Metz: Zijn er duidelijke toepassingsgebieden waarvan u denkt dat die niet genoemd zijn?

Sybesma: Het Centraal Diergeneeskundig Instituut is met monoclonale antilichamen bezig, vooral in het gebied van de virologie. Intervet, ook een firma van het Akzo-concern, in de veterinaire sfeer, is doende om monoclonale antilichamen te produceren, met het oog op beregeur detectie.

Helmond: Wanneer je éénmaal een cellijn hebt die antilichaam maakt, blijft die dan tot in lengte van dagen dezelfde antilichamen produceren; vinden er geen veranderingen plaats?

Egberts: Nee.

Helmond: Ik denk hierbij aan cellijnen die gebruikt zijn bij receptor-onderzoek van borstkankercellen. Het bleek dat die op den duur toch veranderingen ondergingen: het aantal receptoren en de activiteit van de receptoren veranderden.

Egberts: Dat klopt. Algemeen kenmerk van een cellijn is dat hij fenotypisch vaak een bepaald karakter vertoont, maar dat er genotypisch niet één cel gelijk is aan de ander. Cellijnen hebben in het algemeen een zeer variabele genetische samenstelling wat betreft chromosomen. Je zult dus met zekere regelmaat je cellijn moeten controleren en voor de zekerheid af en toe moeten subcloneren: één enkele cel isoleren en van daaruit weer een cellijn opgroeien. Je kunt het probleem ook ondervangen, zoals wij dat doen, door zodra je een cellijn hebt deze in te vriezen. Daarmee is die als het ware gefixeerd. Op elk gewenst moment kun je hem weer ontdooien en heb je je uitgangsmateriaal weer voorhanden. Dus je kunt dit variabiliteitsprobleem gemakkelijk ondervangen.

Garssen: Wanneer het gaat over de laatste stap van de monoclonale-antilichaam produktie dan lijkt mij, te oordelen naar de literatuur, dat meestal de hybridoma's weer teruggespoten worden in de muis, dus in vivo produktie. Heeft de in vitro celkweektechniek nog stappen te overwinnen en zo ja, waar liggen die bottlenecks dan?

Egberts: Dat dacht ik tot voor kort ook. Ik had toen een gesprek met mensen uit het bedrijfsleven en het bleek dat men bezig was een analyse te maken, ook op economische argumenten gebaseerd, van beide methodes van kweken. De indruk bestond dat het niet veel uitmaakte en dan heeft natuurlijk de celkweek in vitro verreweg de voorkeur. Ik twijfel er niet

aan dat er nog wel verbeteringen zijn aan te brengen: de meeste media zijn gebaseerd op ervaringsfeiten en analogieën naar samenstellingen van lichaamsvloeistoffen etc. Mijns inziens is tot dusverre weinig aandacht besteed aan de basale samenstelling van de media. Daarbij komt nog dat een belangrijk element voor de dierlijke celkweek de serumcomponent is. Pas de laatste jaren wordt zeer intensief gezocht naar middelen om die toch weinig gedefinieerde componenten in het medium te vervangen door meer gespecificeerde groeifactoren.

Metz: Een vraag aan Booman is hoe in die EIA-techniek, die kennelijk bruikbaar is voor steroïden (progesteron), anabolica, pesticiden etc., de stof waarop gescreend moet worden, gekoppeld wordt aan eiwit.

Booman: Hiertoe moet je progesteron-antiserum zien te fixeren aan een micro-titerplaat. Voor de rest kom je op het principe van de RIA of EIA.

Metz: Kan bij de bereiding van progesteron-antiserum, progesteron als zodanig gebruikt worden, of moet dit gekoppeld worden aan een eiwit-drager?

Booman: Ja, we hebben het gekoppeld aan bovine serumalbumine (BSA). Het grootste deel van je gefuseerde cellen zal produceren tegen BSA, omdat dat het meest immunogeen is en een groot deel tegen de brug van progesteron en BSA en een klein gedeelte tegen progesteron zelf en dat moet je te pakken zien te krijgen.

Metz: Levert die koppeling als zodanig, voor een breed scala van te screenen stoffen, geen problemen op?

Booman: Nee, op zichzelf niet.

Metz: Er is eigenlijk weinig gesproken over praktische toepassingen in de veehouderij. Is een vorm van hormonale castratie via deze techniek mogelijk? Zou je naast beregeurdiagnostiek in de slachtlijn, de beer er ook van kunnen weerhouden, beregeur te maken? Is het voorstelbaar dat, in plaats van groeihormoongenen in een eicel te brengen, je de effectiviteit van dit hormoon vergroot door antilichaam tegen somatostatine te bereiden en in te spuiten?

Booman: In principe zijn deze zaken mogelijk. Je kunt beregeur neutraliseren, daar zijn voorbeelden van in de literatuur. Je moet per punt goed afwegen. Elk mannelijk dier zal een aantal injecties moeten krijgen; daar staat tegenover dat normaal in de slachtlijn maar één procent van de beren beregeur vertoont. In principe is zo'n passieve immunisatie uit te voeren, mits dat met een homoloog antilichaam gebeurt; en dat is nog een

groot probleem.

X: Ik heb nog een opmerking die aansluit bij die van Sybesma en Dekker, in het kader van de veehouderij. Ik dacht dat men op het Centraal Diergeneeskundig Onderzoek ook bezig was antigenen te bereiden via dit soort technieken. Wanneer deze dezelfde werking zouden hebben als de klassieke entstof dan is dat toch een nieuw gebied dat vandaag nog niet genoemd is. Egberts: Dat heeft op zich niet van doen met het maken van hybridoma's. Dit is normale vaccinbereiding, die op het CDI maar ook op het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en bij bijvoorbeeld IFFA-Mérieux plaatsvindt. Je kunt virus namelijk door middel van een celkweek produceren.

X: Ik dacht dat het erop gericht was om één antigene determinant uit het virus te lichten en die te cloneren.

Y: Er zijn natuurlijk twee soorten immuniteit: passieve en actieve. Door middel van deze hybridoma-techniek krijg je alleen maar passief immuniserende stoffen.

Egberts: Voor de actieve immunisatie hebt u het antigeen nodig, daar komen dit soort geavanceerde technieken niet ter sprake. Wel kan eventueel bij de isolatie van het antigeen voor zo'n actieve immunisatie van de hybridomatechniek gebruik gemaakt worden.

7. TOXICITEITSONDERZOEK MET BEHULP VAN CELKWEESYSTEMEN

Dr. G.M. Alink, Vakgroep Toxicologie, Landbouwhogeschool, Wageningen

De laatste decennia wordt in toenemende mate aandacht geschonken aan de relaties tussen bepaalde exogene factoren in het milieu en in de voeding en het ontstaan van bepaalde ziekten. Dit is niet zo verbazingwekkend als U bedenkt dat het aantal geregistreerde chemische stoffen volgens de American Chemical Society in 1977 4.030.907 bedroeg. Wekelijks komen er 6000 bij. Naar schatting worden jaarlijks 500-700 nieuwe stoffen in het milieu geïntroduceerd.

De toxicologie is de wetenschap die zich bezig houdt met het bestuderen van de schadelijke relaties tussen chemische stoffen en levende organismen. Chemische stoffen kunnen tot intoxicaties leiden in bijvoorbeeld de beroepssfeer (industrie, toepassing bestrijdingsmiddelen). Het is de industriële toxicologie die deze risico's poogt te voorkomen door het aangeven van gevarengrenzen (MAC-waarden) afgeleid van gegevens verkregen uit experimenteel onderzoek.

Chemische stoffen kunnen ook voorkomen in bodem, water en lucht en aldus een risico vormen voor mens, dier en ecosysteem. Deze risico's worden bestudeerd door de milieutoxicologie.

Het meest relevante voor het thema 'dierlijke produktie' zijn de chemische agentia die kunnen voorkomen in (dierlijke) voedingsmiddelen: vlees, vis, gevogelte, zuivelprodukten.

In dierlijke voedingsmiddelen onderscheiden we additieven en contaminanten. Bij plantaardige voedingsmiddelen zouden hier de natuurlijke stoffen nog bijkomen. Het is de voedingsmiddelentoxicologie die zich bezighoudt met de risico's van deze stoffen en die ADI's opstelt, dit zijn de 'acceptable daily intakes'. Stoffen die in dit verband relevant zijn voor de dierlijke produktie zijn: conserveringsmiddelen, kleurstoffen, natuurlijke stoffen, pesticiden, groeistimulerende middelen, antistressmiddelen, antibiotica. Het gaat in de toxicologie om het vaststellen van normen, het vaststellen van voor de mens veilige concentraties.

Toxiciteitsonderzoek

Nadere gegevens omtrent de toxische eigenschappen van chemische stoffen worden verkregen uit experimenteel onderzoek. Het toxiciteitsonderzoek

omvat acuut (50% mortaliteit 2-4 dagen), semi-chronisch (blootstelling 10% levensduur) en chronisch onderzoek (blootstelling 80-90% levensduur) met verschillende soorten proefdieren. Daarnaast nog specifiek onderzoek als teratogeniteits/mutageniteits en carcinogeniteitsonderzoek. Proefdieren worden gebruikt, ervan uitgaande dat dit het beste model is voor de mens.

Het feit dat deze voordracht gewijd is aan het gebruik van celkweeksystemen impliceert niet dat we over celmodellen beschikken die model staan voor de mens, integendeel het extrapoleren vanuit een celkweek is alleen maar gecompliceerder, zo niet onmogelijk. De betekenis van het gebruik van celculturen moeten we dan ook zien vanuit een geheel andere optiek. De laatste jaren wordt steeds meer kennis verkregen over de relatie tussen de chemische structuur van een stof en het effect, de structuur en metabolisme, de structuur en de farmacokinetiek. Op grond hiervan zal het mogelijk worden te voorspellen waar een stof in het lichaam werkzaam is en welke metaboliëten ontstaan. Het karakter van de toxicologie zal de komende jaren mogelijk langzaam gaan veranderen van een empirisch-deductief model, waarin normen voor concentraties van chemische stoffen worden ontleend aan gegevens verkregen uit dierexperimenten, tot een overwegend voorspellend model.

Binnen deze filosofie zal een 'eenvoudig' model als een celcultuur gebruikt kunnen worden om na te gaan wat de primaire receptoren zijn waarmee een stof op moleculair niveau reageert. Andere factoren die deze ontwikkeling van kortdurende voorspellende modellen stimuleren zijn:

a. het grote aantal chemische stoffen dat moet worden getest vereist prescreening; b. meer kennis en inzicht in het werkingsmechanisme; c. de ontwikkeling van geschikte in vitro modellen c.q. celkweeksystemen voor met name specifieke werkingen: mutageniteit, carcinogeniteit, hepatotoxiciteit; d. de nadelen van het gebruik van proefdieren.

Celkweeksystemen, voor- en nadelen

Vergeleken met proefdieren biedt het gebruik van celculturen een aantal voordelen:

1. De relatief eenvoudige dosis-effect kinetiek

De concentratie van een bepaalde stof bij de cellen is meestal exact bekend, dit in tegenstelling tot bij proefdieren, waar als gevolg van de verdeling over lichaamscompartimenten, bloedweefsel barrières, hormonale

en interweefsel effecten de concentratie bij de cellen meestal niet of onvoldoende bekend is. Behalve dosis-effect kunnen ook tijd-effect relaties op eenvoudige wijze worden bestudeerd. Geïnduceerde veranderingen kunnen continu in de tijd worden gevolgd.

2. Fenotypische en genotypische homogeniteit

Dit geldt met name voor cellijnen en celstammen die uit één celtype bestaan. Dit voordeel wordt duidelijk als we bijvoorbeeld denken aan onderzoek naar cellulaire effecten van luchtverontreinigende stoffen op de long, een orgaan waarin 40 verschillende celtypen voorkomen. Met name voor biochemische effecten geldt dat de uitkomst de resultante is van een mogelijk grote verscheidenheid in reacties van de afzonderlijke celtypen. Dit is een grote belemmering bij het onderzoek naar het toxische werkingsmechanisme van luchtverontreinigende stoffen.

3. Ruimtelijke beperking

De proefopstelling en de noodzakelijke technische voorzieningen zijn van beperkte omvang.

4. Vermindering van het gebruikte aantal proefdieren

In dit verband kan gewezen worden op de toenemende discussies in de afgelopen jaren over het gebruik van proefdieren bij het biomedisch en toxicologisch onderzoek, en de toenemende aandacht die internationaal wordt besteed aan het zoeken naar alternatieven.

5. Korte tijdsduur voor het verkrijgen van resultaten

Vergeleken met proefdieren treden de te onderzoeken verschijnselen veelal snel op. Dit is met name van belang voor screeningstesten. De inductie van porfyrynes door polygehalogeneerde koolwaterstoffen in gekweekte hepatocyten treedt op binnen 24 uur, terwijl dit in proefdieren pas waar te nemen is na een aantal weken.

6. Lagere kosten

Dierproeven, met name chronische dierproeven, zijn zeer kostbaar (chronische dierproef f 500.000.-). Mede door bovengenoemde factoren zijn aan experimenten met cellen lagere kosten verbonden.

Hoewel de voordelen van celweeksystemen voor toxicologisch onderzoek groot zijn, kleven ook een aantal belangrijke nadelen aan de toepassing ervan:

1. Extrapolatieproblemen

Doordat in celculturen humorale (immunologische), hormonale, nerveuze en

metabole regulatiemechanismen ontbreken, kunnen de resultaten van dergelijke in vitro proeven niet zonder meer van toepassing geacht worden op in vivo situaties.

2. Geringer differentiatieniveau

Vooraf in cellijnen, maar ook in toenemende mate bij ouder wordende primaire culturen, blijkt sprake te zijn van geringere biochemische, fysiologische en morfologische differentiatie, waardoor niet alle experimenten in vitro uitvoerbaar zijn.

3. Korte levensduur

Vooraf primaire culturen hebben een beperkte levensduur waardoor langlopende proeven niet kunnen worden uitgevoerd. Cellijnen moeten regelmatig worden getrypsiniseerd en overgezet.

4. Geringe hoeveelheid materiaal

De hoeveelheid celmateriaal die beschikbaar is voor proeven onder normale kweekomstandigheden is gering (enkele miljoenen cellen). Dit kan voor bepaalde biochemische metingen te weinig zijn.

De genoemde nadelen zijn van een zodanige aard dat men niet kan verwachten dat celculturen zonder meer en overal dierexperimentele modellen kunnen vervangen. Bovendien kan er bij risico-evaluaties nooit sprake zijn van een directe extrapolatie van de verkregen resultaten naar de menselijke situatie.

Toepassingen van celkweeksystemen

Welke primaire cultuur, celstam of cellijn (er zijn enkele honderden typen beschikbaar, die onder meer worden geleverd door ATCC (America Type Culture Collection), moet worden gekozen om de werking van een bepaalde stof in vitro te bestuderen zal afhangen van de vraagstelling van het onderzoek, en het cellulaire aangrijpingspunt waarop men een effect verwacht.

Men kan de volgende toepassingen onderscheiden:

- a. algemeen celtoxicologisch onderzoek
- b. celspecifiek toxicologisch onderzoek
- c. metabolisme onderzoek

Bij onderzoek a. wordt gekeken naar algemeen cytotoxische effecten. Niet-celspecifieke testparameters kunnen betrekking hebben op de vita-

liteit, groei, metabolisme, membraanintegriteit en morfologie. Ook genetische effecten vallen hieronder. Voor dit doel kunnen we cellijnen van fibroblasten of epitheelcellen gebruiken, die een hoge delingssnelheid hebben en weinig eisen stellen aan de kweekcondities. Een veel gebruikt celtype is de Hela cel.

Bij onderzoek b. gaan we uit van primaire culturen of cellijnen die in meer of mindere mate beschikken over orgaanspecifieke eigenschappen. We gebruiken deze culturen als we stoffen testen waarvan het targetorgaan bekend is. Cellijnen met gedifferentieerde functies zijn meestal tumorcellijnen. Het celspecifieke onderzoek is met name van belang voor de voorspellende toxicologie en het onderzoek naar werkingsmechanismen. Veelal worden primaire culturen gebruikt van hepatocyten (metabolisme), zenuwcellen (neurotransmitterstoffen, neurotransmissie), spiercellen (contractiliteit), macrofagen (fagocytose), maar ook van vele andere celtypen.

In de periode 1976 - 1979 verschenen 236 publikaties over algemeen en specifiek celtoxicologisch onderzoek (met uitzondering van mutagenese en carcinogenese) en 110 over toepassing van celculturen in het metabolisme onderzoek (Tabel 1).

Tabel 1. Publikaties betreffende het gebruik van celculturen in de toxicologie gedurende de periode 1976-1979 (met uitzondering van mutageniteits/carcinogeniteitsonderzoek). (Zucco, 1980).

cellijn		
fibroblasten	pesticiden, geneesmiddelen,	28
epitheelcellen	anorganische, organische ver- bindingen	
longcellen	anorganische verbindingen, geneesmiddelen, sigaretten- rook	13
reticulo-endotheliale cellen	anorganische/organische ver- bindingen	20
levercellen	anorganische verbindingen, geneesmiddelen, pesticiden, oplosmiddelen	17
niercellen	metalen of natuurlijke ver- bindingen	3
zenuwcellen	oplosmiddelen/geneesmiddelen	14
hart/spiercellen	geneesmiddelen/natuurlijke verbindingen	5

Celculturen worden het meeste toegepast, tesamen met andere in vitro systemen (bacteriën) in het voorspellende mutageniteits en carcinogeniteitsonderzoek. Het onderzoek naar genetische effecten van chemische stoffen wordt bijna uitsluitend uitgevoerd met in vitro systemen (Gezondheidsraadrapport - Mutageniteit chemische stoffen). Zowel puntmutaties als chromosoommutaties kunnen worden gedetecteerd. De laatste groep met behulp van cytogenetische technieken. Veel gebruikte testen zijn de chromosoom-aberratietest en de Sister Chromatid Exchange test. Hiervoor worden meestal cellen gebruikt met een gering aantal chromosomen (Chinese hamster). Celculturen worden ook vrij veel gebruikt voor het in vitro carcinogeniteitsonderzoek in de zogenoemde celtransformatietest. Cellen maken in hun ontwikkeling van normale naar tumorcel een groot aantal veranderingen door, zoals verlies van contactinhibitie leidend tot stapeling, dedifferentiatie, biochemische, metabole veranderingen, groei zonder hechting aan een vast oppervlak. Men kent verschillende systemen, uitgevoerd met vooral celstammen waarbij men gebruik maakt van genoemde eigenschappen. Groei in zachte agar - BHK cellen (baby kidney hamster) of Focus-test (berustend op contactinhibitie en stapelingsgroei) - 3T3 muizecellen.

Er wordt over het algemeen een zeer hoge correlatie met carcinogeniteit in vivo gevonden.

Aangezien de metabole capaciteit (gehalte aan microsomale enzymen) van cellijnen over het algemeen zeer gering is, zal de voorspellende werking van celculturen voor de in vivo toxiciteit voor direct toxische stoffen groter zijn dan voor stoffen die eerst gemetaboliseerd moeten worden alvorens ze toxisch zijn.

Voor wat betreft cellijnen is de metabole capaciteit het hoogst in lever-tumorcellijnen. Nog hoger is de metabole activiteit in primaire culturen van levercellen. Op de Vakgroep Toxicologie van de Landbouwhogeschool wordt voor dit doel een primaire cultuur van embryonale kippelevercellen gebruikt.

Dit celkweekstelsel werd onder meer gebruikt voor het bestuderen van de biotransformatie en de porfyriogene werking van hexachloorbenzeen (HCB, een fungicide) en zijn metaboliëten (Debets, 1981). Veel meervoudig gehalogeneerde polycyclische koolwaterstoffen kunnen toxische leverporfyrie veroorzaken bij dier of mens, dit is een verstoring van de haemsynthese

die leidt tot een ophoping en het ontstaan van afwijkende porfyrynes. De ophoping kan na geruime tijd (enkele weken) zichtbaar worden gemaakt in proefdieren onder UV-licht. Bekend is dat HCB gemetaboliseerd moet worden, en vermoed wordt dat uroporfyrinogeen decarboxylase (UROG.D) een sleutelenzym is in de verstoring van de haemsynthese. Verder onderzoek naar het werkingsmechanisme bij proefdieren stuit op problemen gezien onder meer de kortlevende metaboliëten en de lange latentietijd voor het ontstaan van porfyrynes. In kippe-embryo-levercellen veroorzaakt HCB en een aantal andere stoffen ook porfyrie en wel binnen 24 uur. Onderzocht werd of de biotransformatie in de celculturen overeenkomt met die in het proefdier. Diverse metaboliëten bleken aanwezig. Een aantal metaboliëten werden in dit systeem getest; pentachloorthiofenol bleek een porfyriogene werking te hebben, pentachloorfenol bijvoorbeeld niet. Uit dit onderzoek maar ook uit andere onderzoeken blijkt dat primaire culturen van levercellen, gevoelige en bruikbare systemen zijn voor het bestuderen van het metabolisme van lichaamsvreemde stoffen in relatie tot hun toxiciteit.

Wat betreft geïsoleerde cellen in weefselkweek met orgaanspecifieke eigenschappen, worden levercellen het meest toegepast, daarnaast zenuwcellen, longcellen, spiercellen, niercellen en nog enkele andere.

Zenuwcellen zijn afkomstig uit het centrale zenuwstelsel of het ruggemerg, de belangrijkste eigenschappen zijn de afgifte van neurotransmitterstoffen (acetylcholine) en actiepotentialen. Gebruikte longcellen zijn alveolaire macrofagen (fagocytose) en A-549 cellen (pneumocyt type 2, surfactant productie). Geïsoleerde hartcellen behouden het vermogen tot spontane contractie, een zeer gevoelige eigenschap om stoffen te testen zoals bijvoorbeeld glycoalkaloïden, en stoffen die de oxydatieve fosforilering remmen als dinitrofenol.

Slotbeschouwing

Er is een duidelijke plaats voor celweeksystemen in de toxicologische evaluatie van chemische stoffen. Deze verwachting is gebaseerd op een toenemend gebruik van in vitro testen voor screeningsdoeleinden en onderzoek naar werkingsmechanismen.

In het specifieke cel-toxicologische onderzoek, wanneer de cellen moeten beschikken over orgaanspecifieke eigenschappen, wordt het meeste gewerkt met primaire celculturen. Een nadeel van primaire culturen is ondermeer de snelle dedifferentiatie, zoals bijvoorbeeld het verlies van het vermogen tot metabole activatie in levercellen. Ontwikkelingen op het gebied van de synthetische kweekmedia en groeifactoren zijn van belang voor het behoud van gedifferentieerde functies. Echter om een nog beter gebruik te kunnen maken van celculturen in de voorspellende toxicologie, is het van belang cellijnen te ontwikkelen met permanente, gedifferentieerde, orgaanspecifieke eigenschappen. Een mogelijk veelbelovende techniek is die van de celhybridisatie, een techniek, die zoals door andere sprekers aangegeven, op andere vakgebieden reeds belangwekkende resultaten heeft opgeleverd. Het is te wensen dat door dit soort technieken permanente cellijnen ontstaan met een grote voorspellende waarde voor mens en dier, cellijnen die een functie kunnen vervullen binnen het gestandaardiseerde toxiciteitsonderzoek dat tot doel heeft veilige concentraties vast te stellen van de chemische stoffen in ons milieu en in de voeding, en ook die stoffen die van belang zijn voor de dierlijke productie.

Literatuur

- Alink, G.M., J.C.M. van der Hoeven, F.M.H. Debets, W.S.M. van de Ven, J.H. Koeman en J.S.M. Boleij (1979). A new exposure model for in vitro testing of effects of gaseous pollutants on mammalian cells by means of gas diffusion through plastic films. *Chemosphere* 2, 63-73.
- Bergers, W.W.A. en G.M. Alink (1980). Toxic effect of the glycoalkaloids solanine and tomatine on cultured neonatal rat heart cells. *Toxicology Letters* 6, 29-32.
- Debets, F.M.H., J.H. Reinders, A.J.M. Debets, T.G. Lössbroek, J.J.T.W.A. Strik en G. Koss (1981). Biotransformation and porphyrinogenic action of hexachlorobenzene and its metabolites in a primary liver cell culture. *Toxicology* 19, 185-196.
- Grisham, J.W., R.K. Charlton en D.G. Kaufman (1978). In vitro assay of cytotoxicity with cultured liver. Accomplishments and possibilities. *Environ. Health Persp.* 25, 161-171.
- Kruse, P.F. and M.K. Patterson (1973). Tissue culture, methods and applications. Academic Press.
- Paul, J. (1975). Cell and tissue culture. Churchill Livingstone.
- Rofe, P.C. (1971) Tissue culture and toxicology. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 9, 683-696

Rowan, A.N. (1977). Alternatives to laboratory animals in biomedical programmes. *Animal Regulation Studies* 1, 103-128.

Tardiff, R.G. (1978). In vitro methods of toxicity evaluation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 357-369.

Walton, J.R. and J.K. Buckley (1975). Cell models in the study of mechanisms of toxicity. *Agents and Actions* 5, 69-88.

Wiebel, F.J., S. Brown, H.L. Water en J.K. Selkirk (1977). Activation of xenobiotics by mono-oxygenases: cultures of mammalian cells as analytical tool. *Arch. Toxicol.* 39, 133-148.

Zucco, F. (1980). International workshop on the application of tissue culture in Toxicology, Soesterberg.

8. MANIPULATIE VAN DE PENSFERMENTATIE DOOR EXOGENE STOFFEN

Dr.Ir. A. de Jong, Instituut voor Chemotherapie, Bayer AG,
Wuppertal, B.R.D.

Aan het fermentatieproces in de voormagen van een herkauwer kleeft een aantal nadelen die inherent zijn aan een anaeroob gistingsproces door een gemengde microbenpopulatie. Er treden verliezen op van voedselenergie dat in de vorm van warmte en methaangas vrijkomt en van voedselwit dat in ammoniak wordt omgezet. De ammoniak wordt geresorbeerd en in de lever omgezet in ureum dat voor een groot deel met de urine wordt uitgescheiden. Het verlies aan warmte en aan methaan bedraagt gemiddeld respectievelijk 5 en 8% van de bruto-energie terwijl de stikstofverliezen sterk afhangen van de snelheid waarmee ammoniak in de pens vrijkomt en de mate van energiebeschikbaarheid. In wezen zijn er twee mogelijkheden om met technische hulpmiddelen de fermentatieverliezen te beperken. In de eerste plaats bestaan er methoden om de afbraak van voedselcomponenten in de pens te verminderen, teneinde een met minder verliezen gepaard gaande enzymatische vertering nà de voormagen te bewerkstelligen. Daarnaast kan door het toevoegen van additieven aan het voedsel de pensfermentatie ten gunste van het gastdier worden gemanipuleerd.

Ten aanzien van de remming van de methaanproductie door exogene stoffen kunnen twee mechanismen worden onderscheiden. Exogene stoffen kunnen enerzijds hun werking uitoefenen door methanogene bacteriën ten gevolge van toxische effecten direct in hun groei te remmen ('directe methaanremmers'); anderzijds kan de methaanproductie geremd worden door de productie van waterstof - het substraat der methanogene bacteriën - te doen verminderen ('indirecte methaanremmers'). Daar de metabolische waterstof bij de omzetting van pyruvaat in acetylCoA (precursor voor de acetaat- en butyraatsynthese) vrijkomt, impliceert de indirecte remming van de methanogenese een verhoogde productie van propionaat (17, 41). Aangezien de efficiëntie van de acetaat-, propionaat- en butyraatproductie respectievelijk 62, 109 en 78% bedraagt (17), betekent de stimulatie van de propionaatproductie ten koste van de acetaat- en/of butyraatproductie een beduidend efficiëntere fermentatie. Bovendien zijn er aanwijzingen gevonden dat de benutting van propionaat in de weefsels efficiënter plaatsvindt dan die van acetaat (1). In latere studies kon

dit echter niet worden bevestigd (25).

Terwijl een directe remming der methaanproductie wordt bewerkstelligd door een aantal chemische additieven, wordt een indirecte remming met name teweeg gebracht door stoffen van microbiële oorsprong. De invloed van één groep van deze stoffen, polyether antibiotica of ionoforen, op de microbiële fermentatie wordt nader besproken omdat één dezer stoffen, monensin, als groeistimulator op grote schaal wordt toegepast (in de Verenigde Staten sinds 1976 en in de EEG sinds 1978), terwijl voor een aantal andere vertegenwoordigers van deze groep (salinomycine, lasalocid en narasin) aanvragen tot toelating als voederadditief zijn ingediend. Naar alle waarschijnlijkheid wordt lasalocid in 1982 in sommige landen als toevoegmiddel in mengvoeders toegestaan. Nog weer andere polyethers bevinden zich in een experimenteel stadium. De gunstige invloed van glycolipide- en glycopeptide-antibiotica op de pensfermentatie berust vermoedelijk ook op het principe der indirecte remming der methaanproductie (4).

Polyether-antibiotica zijn laag-moleculaire, lipofiele stoffen (moleculgewicht doorgaans tussen 400 en 1200) en worden geproduceerd door streptomyceten, bacteriën van de actinomycetengroep (bijvoorbeeld monensin wordt gesynthetiseerd door *Streptomyces cinnamonensis*). Ze bestaan uit de elementen C, H en O en soms N en bevatten O-bevattende heterocyclische ringen, hydroxyl-, carboxyl-, ether- en ketogroepen. De strategische positie van de O-atomen maken bindingen tussen polaire kationen zoals K^+ , Na^+ of Ca^{2+} en de O-atomen van de ether- of hydroxylgroepen mogelijk. Door deze eigenschap kunnen de polyethers één- of tweewaardige ionen door biologische membranen transporteren (29). Op welke wijze polyethers, of met een functionelere benaming aan te duiden ionoforen, door hun carrierfunctie het cellulaire metabolisme ontregelen, is onduidelijk. Gram-positieve bacteriën zijn gevoeliger voor ionoforen dan gram-negatieve bacteriën. Naast de invloed van ionoforen op de pensfermentatie zijn diverse andere biologische toepassingen bekend. Enige voorbeelden hiervan zijn te vinden in de cardiologie (18), fysiologie (38), neurofysiologie (37), biochemie (34), virologie (5) en in de endocrinologie (30). Bovendien worden de ionoforen toegepast ter preventie van coccidiose (3) en weide- emfyseem (14) of als therapeutikum

tegen acetonemie. Momenteel zijn bijna 100 ionoforen beschreven. Ongeveer 10 jaar geleden werd in een screening-programma met batch culturen geïnoculeerd met pensvloeistof vastgesteld dat monensin dat destijds als coccidiostaticum al enige jaren in de pluimveevoeding werd toegepast, de anaerobe fermentatie modificeert door de produktie van propionzuur te stimuleren ten koste van die van azijnzuur en boterzuur (31, 33). Niet alleen in vitro maar ook in vivo bleek een inverse relatie tussen propionaat enerzijds en acetaat en/of butyraat anderzijds te bestaan indien monensin aan het voedsel werd toegevoegd. De verhoogde concentratie van propionaat in de pensvloeistof is inderdaad toe te schrijven aan een verhoogde produktie zoals met de isotopenverduunnings-techniek gemeten werd (20, 28). Zowel in vitro (batch en continu culturen) als in vivo werd na toediening van monensin een verminderde methaanproduktie zonder noemenswaardige detectie van waterstof vastgesteld (6, 35, 36). Soortgelijke effecten werden bij het testen van andere ionoforen waargenomen (4, 13).

De energetisch efficiëntere pensfermentatie ten gevolge van monensin resulteerde in een sterke produktieverhoging bij mestvee. Raun et al. (1976) vonden gemiddeld een ruim 10% verbeterde voederefficiëntie ten gevolge van zowel een versnelde groei als een verlaagde voeropname. In talloze volgende proeven is onder zeer uiteenlopende omstandigheden de succes story van monensin bij rundvee en schapen bevestigd. Bij doseringen van 5 tot 20 ppm monensin is doorgaans een 0 tot 5% versnelde groei en een 5 tot ruim 10% verbeterde voederconversie bepaald. Bij de hogere doseringen van monensin (20-40 ppm) vinden geen verhoogde gewichtstoenames plaats maar door een sterke remming van de voeropname wordt de voederconversie bijna 10% gunstiger (26). De gereduceerde voeropname zou door een verminderde pensfunctie verklaard kunnen worden (19). De invloed van andere ionoforen op de groei en voederefficiëntie lijkt in dezelfde grootte-orde te liggen als die van monensin (3), maar er zijn nog onvoldoende gegevens beschikbaar om een betrouwbare vergelijking met monensin mogelijk te maken. Bij melkvee zijn ionoforen onder normale omstandigheden niet toepasbaar onder andere omdat ionoforen leiden tot een sterke melkvetdepressie hetgeen voor een veehouder hoogst ongewenst is.

In verschillend onderzoek wordt aan monensin een eiwitsparend effect toegeschreven (40). De effecten van ionoforen op het eiwitmetabolisme in de pens zijn tweërlei: met in vitro technieken is vastgesteld dat niet alleen de proteolyse in de pens door ionoforen geremd wordt maar ook de microbiële eiwitsynthese (2, 4, 23). De hoeveelheid voereiwit die onafgebroken de voormagen passeert neemt toe indien monensin als additief gevoerd wordt terwijl de hoeveelheid bacterieel eiwit afneemt (21, 27). De veelvuldig waargenomen verlaagde ammoniakgehalten in de pensvloei-stof suggereren eveneens een verminderde proteolyse (27). Slechts in enkele proeven nam de totale hoeveelheid stikstof in de lebmaag na het voeren van monensin toe. Het hierboven gerefereerde in vitro werk werd uitgevoerd met niet aan ionoforen geadapteerde bacteriën. Herod et al. (1979) vonden echter geen remming van de microbiële groei wanneer een aan monensin gewende bacteriepopulatie werd genomen. In eigen onderzoek is eveneens vastgesteld dat monensin de afbraak van caseïne niet beïnvloedt indien geadapteerde micro-organismen van schapen werden gebruikt maar wel indien niet-geadapteerde microben genomen worden. Anderzijds constateerden Van Nevel en Demeyer (1979) geen vorm van adaptatie van de microbiële groei in een drieweekse proef in vivo en vonden Whetstone et al. (1981) in een semi-continu batch cultuur systeem met caseïne als substraat geen adaptatie-effecten na toediening van monensin. Andere vormen van adaptatie zijn ook waargenomen: zo werd een verminderde ruwe celstof afbraak gemeten na het voeren van monensin gedurende 2 weken maar niet na 7 weken (27). In vitro oefende monensin een sterke remming van de cellulose-afbraak uit met gebruik van niet-geadapteerde bacteriën; werden daarentegen pensvloei-stofinocula genomen van schapen die gedurende 1 maand monensin als voederadditief toegediend hadden gekregen, dan bleek van verminderde cellulose-afbraak geen sprake meer (De Jong, manuscript in voorbereiding). De uitkomsten van in vitro werk met niet aan een ionofoor geadapteerde microbenpopulatie hoeven dus de invloed van dit ionofoor in vivo niet te weerspiegelen.

De gunstige invloed van ionoforen op de produktie kan niet altijd door de energiebesparende verhoging van de propionaatproduktie en de eiwitbesparende werking verklaard worden. In het complexe pens-ecosysteem kunnen echter meer gunstige veranderingen plaatsvinden.

Het is niet verwonderlijk dat monensin de pensprotozoënpopulatie redu-

ceert (27) gezien het feit dat ionoforen benut worden om pathogene protozoën te bestrijden en dat er een hechte symbiose tussen pensprotozoën en methanogene bacteriën is aangetoond. Hoewel protozoën een nadelige invloed op de microbiële groei uitoefenen, is het enigszins voorbarig om te concluderen dat een reductie van het aantal protozoën zonder meer voordelig is. Zowel monensin als lasalocid remt de groei van twee belangrijke lactaat-producerende bacteriën - *Streptococcus bovis* en *Lactobacilli* species - (11) en beide ionoforen verhinderen experimentele melkzuur acidose (22). Bij normale rantsoenen is daarentegen geen één-duidig effect van monensin op D- en L-lactaat gehaltes van de pensvloeistof te herkennen (eigen onderzoek). Lasalocid is in tegenstelling tot monensin effectief als therapeutikum tegen monensin. Het feit dat in sommige studies monensin de turnover van de vloeibare en vaste fase vermindert (19, 28), suggereert een intensievere pensfermentatie. Het tegengestelde is echter aangetoond: er vindt een verschuiving van de organische stofvertering van de pens naar de dunne darm plaats (21). Monensin schijnt geen effect op de penswandmotiliteit uit te oefenen.

Studies met reinculturen hebben meer inzicht verschaft in het werkingsmechanisme van ionoforen op de pensflora. De ionoforen monensin en lasalocid oefenen niet een toxische werking op methanogene bacteriën uit zoals het geval is bij de directe methaanremmers, maar remmen of vertragen de groei van waterstof en formiaat producerende bacteriën terwijl succinaat- en propionaatproducers ongemoeid gelaten worden (7, 12, 15). Zo werden veel voorkomende gram-positieve bacteriën als *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* en *Butyrivibrio fibrisolvens* door geringe doses monensin en lasalocid sterk in groei geremd, de groei van *Bacteroides succinogenes* en van *Bacteroides ruminicola* werd door beide ionoforen vertraagd en die van *Selenomonas ruminantium* werd niet door hogere doses van monensin of lasalocid beïnvloed. Uit de studie van Van Nevel en Demeyer (1977) valt af te leiden dat monensin de activiteit van formiaatlyase van formiaatsplitsende bacteriën verlaagt zodat minder waterstof voor de methaanvorming beschikbaar is. Hoe de selectie tegen de waterstofvormers tot stand komt, is onbekend.

De mogelijkheden om directe methaanremmers, zoals bijvoorbeeld hogere vetzuren en gehalogeneerde methaan analogen, als voederadditief toe te

passen lijken niet rooskleurig. De hogere vetzuren zouden de methanogenese op fysisch-chemische wijze remmen (10) terwijl de gehalogeneerde stoffen de cobamide-afhankelijke methyloverdracht zouden remmen (10, 42). In in vitro werk komt de energetisch gezien gunstige invloed van directe methaanremmers op de pensfermentatie duidelijk naar voren (6, 9, 10, 35); in veel gevallen remmen deze stoffen de methaanproductie vrijwel volledig in tegenstelling tot de indirecte methaanremmers die een partiële inhibitie veroorzaken. De toepassing van directe methaanremmers als voederadditief wordt echter behalve door de vluchtigheid en de toxische werking van sommige dezer stoffen belemmerd door de geringe en/of variabele groeibevorderende werking. Dit laatste punt heeft ongetwijfeld te maken met het feit dat er vaak gewinning aan deze methaanremmers optreedt (8).

Slotbeschouwing

Diverse in vitro technieken vormen betrouwbare en onmisbare hulpmiddelen om de invloed van ionoforen of andere exogene stoffen op de pensfermentatie vast te stellen. Desondanks is het noodzakelijk om proefuitkomsten verkregen met in vitro technieken in vivo te controleren om te vermijden dat bijvoorbeeld ten gevolge van dier-gebonden factoren of adaptatie de in vitro resultaten effecten in vivo niet weerspiegelen. De veranderingen in het vetzuurpatroon van de pensfermentatie kan slechts een deel van het gunstige effect van ionofore antibiotica op de voederefficiëntie verklaren. Vermoedelijk draagt onder meer een verschuiving van de eiwitvertering bij tot de gunstige invloed van de ionoforen op de dierlijke productie.

Literatuur

1. Annison, E.F., en Armstrong, D.G. (1970). In: Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant (Ed. A.T. Phillipson) Oriel Press Ltd., Newcastle upon Tyne, p. 422-437.
2. Bartley, E.E., Herod, E.L., Bechtel, R.M., Sapienza, D.A. en Brent, B.E. (1979). J. Anim. Sci., 49: 1066-1075.
3. Berger, L.L., Riche, S.C. en Fahey, G.C., Jr. (1981). J. Anim. Sci., 53: 1440-1445.
4. Cafantaris, B. (1981). Dissertatie, Universiteit van Stuttgart-Hohenheim.

5. Cash, P. (1982). *J. gen. Virol.*, 59: 193-196.
6. Chalupa, W., Corbett, W. en Brethour, J.R. (1980). *J. Anim. Sci.* 51: 170-179.
7. Chen, M. en Wolin, M.G. (1979). *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 72-77.
8. Clapperton, J.L. (1977). *Anim. Prod.*, 24: 169-181.
9. Davies, A., Nwaonu, H.N., Stanier, G. en Boyle, F.T. (1982). *Br. J. Nutr.*, 47: 565-576.
10. Demeyer, D.I. en Nevel, C.J. van (1975). In: *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. (Eds. I.W.McDonald en A.C.I. Warner) Univ. New England Publ. Unit, p. 366-382.
11. Dennis, S.M., Nagaraja, T.G. en Bartley, E.E. (1981). *J. Dairy Sci.*, 64: 2350-2356.
12. Dennis, S.M., Nagaraja, T.G. en Bartley, E.E. (1981). *J. Anim. Sci.*, 52: 418-426.
13. Fuller, J.R. en Johnson, D.E. (1981). *J. Anim. Sci.*, 53: 1574-1580.
14. Hammond, A.C. en Carlson, J.R. (1980). *J. Anim. Sci.*, 51: 207-214.
15. Henderson, C., Stewart, C.S. en Nekrep, F.V. (1981). *J. Appl. Bact.*, 51: 159-169.
16. Herod, E.L., Bartley, E.E., Davidovich, A., Bechtle, R.M., Sapienza, D.A. en Brent, B.E. (1979). *J. Anim. Sci.*, 490 (Suppl.1): 374.
17. Hungate, R.E. (1966). *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York.
18. Kabell, G., Scherlag, B.J., Guse, P., Hope, R.R. en Lazzara, R. (1980). *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 3: 61-74.
19. Lemenager, R.P., Owens, F.N., Shockey, B.J., Lusby, K.S. en Totusek, R. (1978). *J. Anim. Sci.*, 47: 255-261.
20. Maanen, R.W. van, Herbein, J.H., McGilliard, A.D. en Young, J.W. (1978). *J. Nutr.*, 108: 1002-1007.
21. Muntifering, R.B., Theurer, B. en Noon, T.H. (1981). *J. Anim. Sci.*, 53: 1565-1573.
22. Nagaraja, T.G., Avery, T.B., Bartley, E.E., Roof, S.K. en Dayton, A.D. (1981). *J. Anim. Sci.*, 54: 649-658.
23. Nevel, C.J. van, en Demeyer, D.I. (1977). *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 251-257.
24. Nevel, C.J. van, en Demeyer, D.I. (1977). *Ann. Rech. Vet.*, 10: 338-340.

25. Ørskov, E.R. (1975). *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 22: 152-182.
26. Owens, F.N. (1980). *Proc. Georgia Nutr. Conf., Univ. of Georgia, Athens*, p. 17-25.
27. Poos, M.I., Hanson, T.L. en Klopfenstein, T.J. (1979). *J. Anim. Sci.*, 49: 1516-1524.
28. Prange, R.W., Davis, C.L. en Clark, J.H. (1978). *J. Anim. Sci.*, 46: 1120-1124.
29. Pressman, B.C. (1976). *Annu. Rev. Biochem.*, 45: 501-530.
30. Randel, R.D., Rutter, L.M. en Rhodes III, R.C. (1982). *J. Anim. Sci.*, 54: 806-810.
31. Raun, A.P. (1974). U.S. Patent 3.790.667.
32. Raun, A.P., Cooley, C.O., Potter, E.L., Rathmacher, R.P. en Richardson, L.F. (1976). *J. Anim. Sci.*, 43: 670-677.
33. Richardson, L.F., Raun, A.P., Potter, E.L., Cooley, C.O. en Rathmacher, R.P. (1976). *J. Anim. Sci.*, 43: 657-664.
34. Srinivas, R.V., Melsen, L.R. en Compans, R.W. (1982). *J. Virol.*, 42: 1067-1075.
35. Stanier, G. en Davies, A. (1981). *Br. J. Nutr.*, 45: 567-578.
36. Thorton, J.H. en Owens, F.N. (1981). *J. Anim. Sci.*, 52: 628-634.
37. Vaccaro, K.K., Liang, B.T., Sheard, B.E. en Perlman, R.L. (1982). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 221: 536-540.
38. Watson, E.L., Farnham, C.J. Friedman, J. en Farnham, W. (1981). *Am. J. Physiol.*, 240: C189-C192.
39. Whetstone, H.D., Davis, C.L. en Bryant, M.P. (1981). *J. Anim. Sci.*, 53: 803-809.
40. Willis, C.M. en Boling, J.A. (1982). *Nutr. Rep. Int.*, 25: 399-407.
41. Wolin, M.J. (1960). *J. Dairy Sci.*, 43: 1452-1459.
42. Wood, J.M., Moura, I., Moura, J.J.G., Santos, M.H., Xavier, A.V., LeGall, J. en Scandellari, M. (1982). *Science*, 216: 303-305.

9. HET GEBRUIK VAN IN VITRO TECHNIEKEN VOOR HET VASTSTELLEN VAN NEVEN-EFFECTEN VAN ANTIBIOTICA OP HET IMMUUNSYSTEEM

Drs. J.L. Grondel, Dr. E. Egberts en Dr. W.B. van Muiswinkel,
Vakgroepen Experimentele Diermorphologie/Celbiologie en Veehouderij,
Landbouwhogeschool, Wageningen

Inleiding

Het immuunsysteem stelt mens en dier in staat zich te verweren tegen ziekteverwekkende micro-organismen en/of lichaamsvreemde stoffen (antigenen) welke het lichaam trachten binnen te dringen. De aanwezigheid van antigenen zal in eerste instantie gesignaleerd moeten worden (herkenning) waarna een gericht antwoord (specifiek) zal volgen. Het immuunapparaat heeft zich bij gewervelde dieren ontwikkeld tot een complex stelsel van weefsels en cellen die met elkaar samenwerken. Verschillende celtypen zijn direct betrokken bij de immuunrespons en dragen zorg voor een afweerreactie van het lichaam tegen een infecterend agens. Hiertoe behoren de lymfocyten die deel uitmaken van het totaal aan witte bloedcellen (leukocyten) en die op grond van hun ontwikkeling en functie(s) in B- en T-lymfocyten zijn te verdelen. B-lymfocyten ontwikkelen zich bij vogels in de Bursa van Fabricius en bij zoogdieren onder andere in het beenmerg. Na contact met een antigeen nemen deze cellen toe in aantal en veranderen voor een deel in plasmacellen, die een immunoglobuline (antilichaam) afgeven dat kan binden met het desbetreffende antigeen. Hierdoor kunnen zich antigeen-antilichaam complexen vormen, die versneld onschadelijk worden gemaakt door fagocyterende cellen (o.a. macrofagen). De T-lymfocyten ontwikkelen zich in de thymus. Een deel daarvan kan met virus geïnfecteerde cellen en/of tumorcellen doden. T-cellen spelen ook een rol bij de transplantaatafstoting. Daarnaast bevinden zich onder de T-lymfocyten cellen, die een regulerende invloed uitoefenen op het verloop van een immuunrespons. Deze invloed kan zowel stimulerend (T-helper cellen) als remmend (T-suppressor cellen) zijn.

Elke respons van het immuunapparaat kan in grote mate versterkt worden en staat onder strikte controle. Zowel B- als T-lymfocyten bevatten op hun celoppervlak herkenningsmoleculen (receptoren) voor een bepaald antigeen. Vaak moet het antigeen nog op een of andere wijze bewerkt worden voordat het in contact kan treden met deze receptoren. Dit geschiedt door middel

van macrofagen, die het antigeen vervolgens aan T-lymfocyten aanbieden. Door dit samenspel worden regulerende produkten (interleukinen) vrij gegeven die de respons zullen versterken. Interleukine 1 (IL1) wordt in de geschetste situatie door macrofagen geproduceerd en zet T-helper cellen in combinatie met de antigene stimulatie aan tot produktie van interleukine 2 (IL2), dat andere T-lymfocyten tot proliferatie en differentiatie aanzet. Ook voor de proliferatie en differentiatie van B-lymfocyten tot plasma-cellen zijn naast de interactie tussen het antigeen en de receptor van de B-lymfocyt de regulerende factoren noodzakelijk. Uit deze schematische en enigszins vereenvoudigde beschrijving van een immuunrespons blijkt dat cel-cel contacten zowel als factoren, welke via bepaalde receptoren op de cel inwerken, bij deze interacties een belangrijke rol spelen.

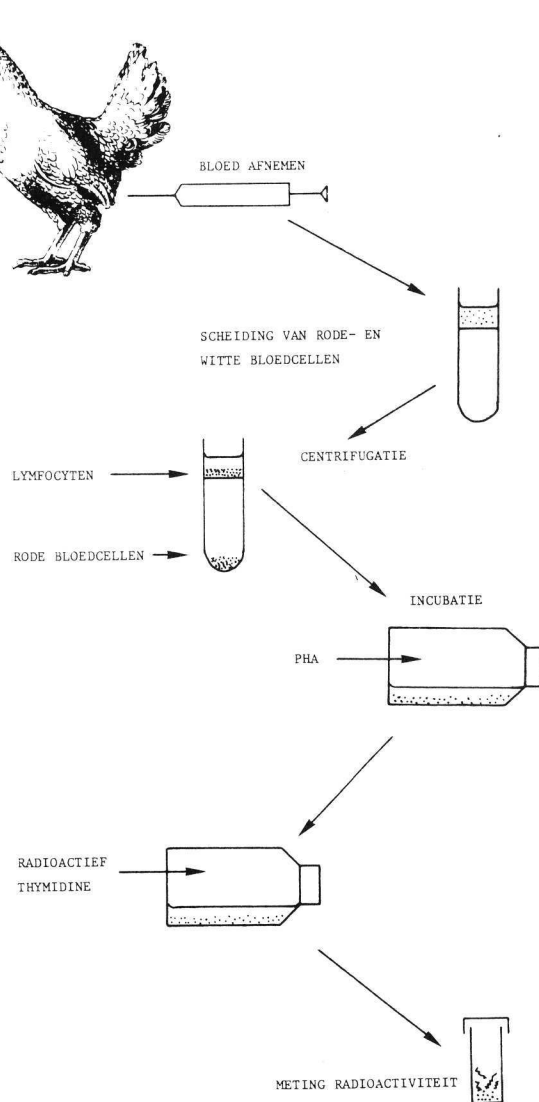
Deze verschillende interacties van lymfocyten en macrofagen tijdens een immuunreactie doen zich niet alleen voor in vivo, maar ook in vitro, bijvoorbeeld in een lymfocyten stimulatietest.

Het principe van de lymfocyten stimulatietest

Bij de inductie van een immuunrespons in vitro is het aantal cellen dat specifiek met het antigeen kan reageren gering. Hierdoor zijn de effecten van de activatie van antigeenspecifieke lymfocyten tegen de achtergrond van het grote aantal niet-gestimuleerde lymfocyten moeilijk meetbaar. Dit probleem kan ondervangen worden door het gebruik van mitogenen die lymfocyten onafhankelijk van hun specificiteit voor antigeen kunnen aanzetten tot celdeling. De meeste van deze mitogenen behoren tot de groep van koolhydraatbindende eiwitten, de zogenaamde lectines. Sommige hiervan, bijvoorbeeld phytohemagglutinine (PHA), stimuleren alleen T-lymfocyten, andere, zoals lipopolysaccharide van gram-negatieve bacteriën, alleen B-lymfocyten. Ook zijn er mitogenen bekend die zowel T- als B-lymfocyten tot activiteit aanzetten, bijvoorbeeld 'pokeweed mitogen'. De celdeling, maar vooral de daaraan voorafgaande DNA-synthese wordt gebruikt als parameter. Aan het in vitro systeem kan op eenvoudige wijze radioactief thymidine toegevoegd worden. Een aantal uren later wordt bepaald hoeveel thymidine in het DNA is ingebouwd (zie figuur 1).

Hoewel de door lectines geïnduceerde celdeling van lymfocyten in vitro een kunstmatig karakter draagt, is het hele proces vergelijkbaar met de

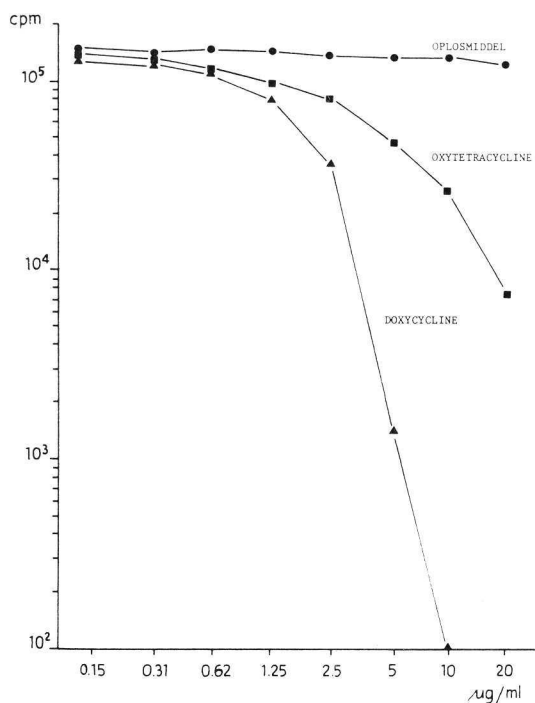
reacties van lymfocyten op antigeen. Daardoor is de lymfocyten stimulatietest een uiterst nuttig hulpmiddel om de invloed van exogene factoren op het immuunsysteem van een dier vast te stellen.



Figuur 1. De lymfocyten stimulatietest

De invloed van antibiotica op de respons in vitro

Indien exogene factoren het immuunsysteem beïnvloeden kan dit grote gevolgen hebben voor de weerstand van de dieren. Vooral in de intensieve veehouderij waarbij het aanbod van micro-organismen (antigenen) groot zal zijn wordt een zware wissel getrokken op het functioneren van het afweermechanisme. Enkele antibiotica bijvoorbeeld oxytetracycline en doxycycline zijn in staat de immuunrespons in vitro te remmen (zie figuur 2). De concentraties waarbij 50% inhibitie optrad waren respectievelijk 3,5 en 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Deze waarden komen overeen met die welke in vivo bereikt dienen te worden voor een effectieve therapeutische behandeling.



Figuur 2. In bovenstaande figuur zijn de resultaten weergegeven van een lymfocyten stimulatietest en de beïnvloeding daarvan door het oplosmiddel van oxytetracycline, oxytetracycline en doxycycline. In deze test werd de celdeling van lymfocyten, geïsoleerd uit een karper, geïnduceerd door het mitogeen PHA. Na drie dagen kweken werd aan het medium radioactief thymidine toegevoegd en op de vierde dag werd de in het DNA ingebouwde activiteit bepaald. Deze activiteit wordt weergegeven in 'counts per minute' (cpm). De hoeveelheid toegevoegd antibioticum wordt weergegeven in $\mu\text{g/ml}$.

Het effect van antibiotica berust weliswaar op een bacteriostatische of bactericide werking, maar in beide situaties zal het afweermechanisme er zorg voor moeten dragen dat de micro-organismen geëlimineerd worden.

De constatering van bovengeschetste beïnvloeding van de immuunrespons in vitro door oxytetracycline en doxycycline is natuurlijk niet voldoende. Het nodigt uit tot nader onderzoek waarbij enkele vragen centraal staan, ten eerste: Waar grijpen deze stoffen aan binnen het complexe gebeuren van de immuunrespons? Ten tweede: Wordt de immuunrespons in vivo ook beïnvloed? Op de eerste vraag kan vooralsnog geen uitsluitel worden gegeven, maar de tweede vraag kan bevestigend beantwoord worden. Het blijkt dat therapeutische doses de immuunrespons van zowel karpers als kippen doen veranderen. Concluderend kan er gesteld worden dat bepaalde antibiotica de immuunrespons kunnen beïnvloeden, hetgeen implicaties kan hebben voor het gebruik van deze antibacteriële middelen in de praktijk.

De boven beschreven methode maakt het mogelijk een groot scala aan exogene factoren in vitro te testen (screening) op hun immunomodulerende of toxische eigenschappen. De lymfocyten stimulatietest wordt in dat geval uitgevoerd met cellen van gezonde en onbehandelde dieren. Deze lymfocyten kunnen uit het bloed geïsoleerd worden, waardoor de proefdieren gespaard blijven. Op een vergelijkbare wijze kan ook het reactievermogen (gezondheidstoestand) van dieren in het algemeen nader worden bekeken. Het reactievermogen kan namelijk beïnvloed worden door vele factoren zoals ziekten, stress, milieuverontreiniging en de reeds genoemde antibiotica. Tevens is het mogelijk om het effect van vaccinaties na te gaan wanneer mitogenen in de test vervangen worden door het bij de vaccinatie gebruikte antigeen. Al met al blijken deze kortdurende kweekmethoden waardevolle gegevens voor de praktijk te kunnen opleveren.

Literatuur

Rijkers, G.T., Van Oosterom, R. and Van Muiswinkel, W.B. (1981). The immune system of cyprinid fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (Cyprinus carpio). Veterinary Immunology and Immunopathology 2, 281-290.

Grondel, J.L. and Boesten, H.J.A.M. (1982). The influence of antibiotics on the immune system I. Inhibition of the mitogenic leukocyte response in vitro by oxytetracycline. Developmental and Comparative Immunology, Supplement 2, 211-216.

Ling, N.R. and Kay, J.E. (1975). Lymphocyte stimulation. Elsevier/North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

Roitt, I.M. (1980). Essential immunology. Blackwell Scientific Publications, London.

Discussie 'blok' 3

De Vries: Een detail uit het verhaal van Grondel heb ik gemist. Het leek mogelijk om tritium-thymidine te vervangen door iets anders, dat de proliferatie kan weergeven in de celweek.

Grondel: Het is mogelijk gebleken dat bepaalde fluorescerende stoffen, tijdens de proliferatiefase, ingebouwd worden in het DNA. Dat kun je door middel van een cell-sorter meten. Het blijft een vraag of die stof schadelijk is, maar je bent niet meer met radioactiviteit bezig. Dit wordt toegepast, maar je hebt wel speciale apparatuur nodig.

Garssen: Die stof intercalceert in het DNA?

Grondel: Ja.

Garssen: De kosten van zo'n cell-sorter lagen nogal hoog.

Grondel: Die in Rijswijk, Nijmegen en Rotterdam liggen in de buurt van één miljoen gulden, maar je hebt ze ook op commerciële basis, dan zijn ze natuurlijk ook eenvoudiger.

Dekkers: Kun je zomaar overstappen van proefdieren op celculturen; zijn er vergelijkende studies gedaan waarbij je een hoge correlatie kunt aantonen?

Alink: Natuurlijk kan dit niet zomaar. Je komt nooit zover dat je voor alle typen toxiciteitsonderzoek gebruik kunt maken van celculturen. Bij bepaalde typen onderzoek, het best geïllustreerd aan mutageniteitsonderzoek, heeft men een sterke correlatie (tot 80%) gevonden tussen mutagene effecten in celculturen en die in vivo (beenmergcellen). Ook een hoge correlatie (90%) wordt gevonden tussen celtransformatietesten (met BHK en 3T3 cellen) en in vivo carcinogeniteitstesten. Een probleem is dat deze testen moeilijk uit te voeren zijn en dat er weinig geschikte systemen zijn. Het lukt vaak in één laboratorium maar elders niet.

Tamminga: De Jong heeft gezegd dat er naast monensin ook nog glyco-peptide-antibiotica zijn en die zouden eveneens een werking op menselijke organen hebben. Is de werking van deze antibiotica vergelijkbaar met die van monensin en zouden er niet aantrekkelijker verbindingen zijn in verband met residue kwesties?

De Jong: Uit een aantal onderzoeken blijkt dat ze enigszins vergelijkbaar zijn met de polyethers. Er ontstaat een geringe remming van de methaanproductie en een stimulatie van de propionaatproductie ten koste van azijn- en boterzuur. Het effect op de eiwithuishouding is minder bekend, en hoe ze werken daar is ook weinig van bekend. Ik betwijfel of ze in

verband met residuen geschikter zijn dan monensin, dat nauwelijks residuen geeft en volledig is vrijgegeven. Twee van de glycopeptide - en glycolipide antibiotica (flavomycine en avoparcin) zijn ook als voederadditief toegestaan.

Tamminga: Je vindt weinig residuen met monensin; beperkt dat zich tot het dierlijk eindprodukt of wordt het volledig afgebroken?

De Jong: Voor zover ik weet wordt monensin vrijwel niet geresorbeerd en wordt het in het maagdarmkanaal afgebroken (1, 2).

X: Ik dacht dat het voor 98% uitgescheiden werd en 14 dagen tot 2 maanden nodig heeft in de mest om volledig afgebroken te worden.

Grondel: Als U dat lijstje met ongewenste effecten van antibiotica hebt gezien, bent U dan nog voorstander van het gebruik hiervan als voederadditief?

De Jong: Ja, je zou dat van elk antibioticum moeten testen, ik denk dat de door mij besproken ionofore antibiotica een vrij gunstige groep is.

De Vries: In de Verenigde Staten is door de fabrikanten een uitgebreid dossier overgelegd waarin zeer veel gegevens over monensin, zoals stabiliteit, persistentie etc., ook in het milieu. Daaruit blijkt dat de verbinding voor meer dan de helft afgebroken in de mest verschijnt en dat de halfwaardetijd in mest minstens enkele weken bedraagt. De stof is in het milieu onder normale omstandigheden buitengewoon instabiel. Verder treedt er geen accumulatie en residuevorming in planten op.

Grondel: Ik heb geen gelegenheid gehad om méér te vertellen over antibioticum gebruik. Ik heb hier een screeningstest aangedragen voor een hele reeks stoffen. Het is eigenlijk te gek dat je in de veehouderij (en het hospitaal) met resistentieproblemen te maken hebt, die bijzonder groot zijn. Dat je juist in de veehouderij door gebruik van lage concentraties antibioticum, die de voederconversie verbeteren, de groei bevorderen etc. wèl de resistentie verhoogt en wel zodanig dat op een gegeven moment bepaalde antibiotica niet meer gebruikt kunnen worden. Dit is een resistentieprobleem. Ik moet me houden bij de immunologie en van daaruit zeg ik, U bent bezig de weerstand van het dier te veranderen. Met de populatie binnen de darm wordt iets gedaan, er wordt een stam uitgeschakeld, er komt een mutatie of een resistente stam; wat heeft dat voor invloed op het dier zelf? De weerstand is verlaagd; dit geldt voor één antibioticum: oxytetracycline. Deze stof is hier niet toegestaan, tenminste niet continue, in de Verenigde Staten wel en wordt daar op grote

schaal toegepast. Het is echter niet bekend of het immuunapparaat daarvoor geremd wordt.

Metz: Het is een gewetensvraag voor mensen in de veehouderij of je het gebruik van additieven in de vorm van antibiotica moet propageren wanneer het economisch rendabel is. Ik ben blij dat Grondel ons een figuur liet zien waarop enerzijds het effect van antibiotica en anderzijds ook de factor bedrijfshygiëne voorkwam. Een deel van de gunstige effecten die je met antibiotica bereikt, zijn ook te bereiken bij een betere beheersing van de hele dierlijke produktie keten, zoals arbeidsdiscipline en een effectieve toepassing van wat onderzoek aandraagt (3).

Alink: De afwegingen zijn van verschillende aard: ethische, economische voor- en nadelen. Voor mijn gevoel is er een groot verschil tussen antibiotica die dienen ter bestrijding van infectieziekten en bijvoorbeeld polyether-verbindingen, waar De Jong het over had, die tot doel hebben het voedergebruik iets efficiënter te laten plaatsvinden.

Ik begreep van De Jong dat het voedergebruik ten hoogste 8% gunstiger zou worden.

De Jong: Dat is nogal wat!

Alink: Ik heb niets gehoord over eventuele toxicologische effecten. Die zijn kennelijk niet belangrijk omdat geen residuevorming plaatsvindt. Je zou je nog kunnen afvragen of er bepaalde toxische effecten op het dier zelf zijn en hoe het zit met de voedselregulatie, de fysiologie daarvan. Verandert die door het toepassen van dit soort stoffen?

De Jong: Om te beginnen met het laatste: je hebt kunnen zien dat er een verminderde voedselopname plaatsvindt; men denkt dat dit komt doordat het voer minder smakelijk wordt. Een aspect wat ik niet aangeroerd heb, is dat de passagesnelheid van vaste en vloeibare delen door de voormagen vertraagd is; dat zou óók kunnen samenhangen met de gereduceerde voedselopname. Wat de toxische aspecten betreft en residuevorming, ik heb me met opzet beperkt tot het voedingsfysiologische gedeelte.

-
1. Owens, F.N. (1980) Proc. Georgia Nutr. Conf., Univ. of Georgia, Athens, p. 17-25.
 2. Oostendorp, D. en Harmsen, H.E. (1981) Boerderij/Veehouderij 66, 23 december.
 3. Voorzover het monogastrische dieren betreft (varkens, pluimvee) is De Jong het met deze opmerking volledig eens (noot van de auteur).

In de serie studierapporten verschenen:

	<u>Prijs</u>
1. Rapport van de Commissie Veehouderij - Welzijn Dieren. Den Haag, 1975.	f 10,-
1a. Report of the Dutch Committee of Experts on Animal Husbandry and Welfare. Den Haag, 1977.	f 5,-
2. Ontwikkelingsplan dierlijk produktie onderzoek. Den Haag, 1976:	
deel I: Ontwikkeling van het dierlijk produktie onderzoek in hoofdlijnen	f 5,-
deel II: Ontwikkeling van het dierlijk produktie onderzoek per deelterrein	f 20,-
deel III: Ontwikkelingsplan dierlijk produktie onderzoek werkwijze	f 5,-
3. Rapport van de Stuurgroep Alternatieve Landbouw. Den Haag, 1977.	-
4. Verslag van de Werkgroep Natuur- en Landschapsbeheer door Landbouwbedrijven. 1979.	-
5. De voorlichting over het landbouwkundig onderzoek aan het algemene publiek. Den Haag, 1980.	-
6. Basis voor onderzoekvoorstellen betreffende (industriële) zonne-energiewinningsprocessen afgeleid van biologische principes. Den Haag, 1980.	f 12,50
7. De toelevering van informatie over lopend onderzoek aan gegevensbestanden. Veerman, J., Den Haag, juli 1980.	f 5,-
8. De omvang van het landbouwkundig onderzoek. Den Haag, 1980.	f 5,-
9. Biotechnologie in het landbouwkundig onderzoek. Den Haag, januari 1981.	f 12,50
10. Meerjarenvisie landbouwkundig onderzoek 1982-1986	f 15,-
11. Industriële toepassingen van landbouwgrondstoffen. Den Haag, 1981.	f 10,-
12. Voorzieningen voor landbouwwetenschappelijke informatie- verzorging. Den Haag, 1982.	f 12,50
13. Energiegewassen in Nederland. Den Haag, 1982.	f 10,-
14a. Genetische manipulatie in dienst van de landbouw. Den Haag, 1982.	f 10,-
14b. Commerciële aspecten van plantenbiotechnologisch onderzoek.	f 5,-
14c. Ontwikkelingen in het moleculair en celbiologisch onderzoek ten behoeve van de dierlijke produktie. Den Haag, 1983.	f 10,-

In de serie research management studies verschenen:

	<u>Prijs</u>
1. Projectbeschrijving en projectbeheer in het landbouwkundig onderzoek. 2e herziene druk, Den Haag, 1969.	f 5,-
2. Economische evaluatie van het landbouwkundig onderzoek. Den Haag, 1970.	f 5,-
3. Organisatiestructuur landbouwkundig onderzoek en achtergronden van haar totstandkoming. Verkaik, A.P., Den Haag, 1972.	f 5,-
4. Waarheen met de structuur van het landbouwkundig onderzoek. Verkaik, A.P., Den Haag, 1971.	f 5,-
5. Van proefveld naar klimaatkamer. Commissie Fytotrons TNO. Den Haag, 1972.	f 5,-
6. Rubriceringsschema 1972 Landbouwkundig Onderzoek. Commissie herziening rubriceringsschema. Den Haag, 1972.	f 5,-

7. Beschouwing over de organisatie van het onderzoek in Nederland.
Wansink, G. en anderen. Den Haag, 1973. f 5,-
8. Proefevaluatie onderzoekprojecten. Dijkveld Stol, N.A. en
Höbaus, P., Den Haag, 1974. f 5,-
9. Richtlijnen beschrijving en verslaglegging projecten.
Begeleidingscommissie voor de projectenadministratie.
Den Haag, 1976. f 5,-
10. Richtlijnen financiële administratie projecten. Begeleidings-
commissie projectenadministratie. Den Haag, 1976. f 5,-
11. Verkenningen omtrent de doelstellingsproblematiek in arbeids-
organisaties. Verkaik, A.P., Den Haag, 1977. uitverkocht
12. Handleiding beoordeling en selectie onderzoekprojecten.
Dijkveld Stol, N.A., Den Haag, 1979. f 5,-
13. Te hanteren overwegingen bij de koersbepaling van het
landbouwkundig onderzoek. Den Haag, 1980. f 10,-

Deze studies kunnen worden besteld bij het secretariaat van de Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek, Postbus 297, 2501 BD 's-Gravenhage, tel. 070 - 471021.