

6 Gelukkig hebben we de genen nog

IN 1992 werd in Rio de Janeiro de conventie voor biologische diversiteit opgesteld. Veel landen hebben deze conventie ondertekend. Deze landen hebben zich daarmee onder andere verantwoordelijk gesteld voor het behoud van de in die landen voorkomende genetische diversiteit van landbouwgewassen en landbouwhuisdieren. Een manier om de genetische diversiteit te bewaren is om het gebruik van lokale rassen te stimuleren en om inteelt te voorkomen. Een andere manier is om genetisch materiaal als zaad van planten of sperma of embryo's van dieren op te slaan in een genenbank.

Een koelhuis vol plantenembryo's

Bij planten spreek je meestal over zaad, alleen is dat ander zaad dan het zaad van dieren. Feitelijk is een plantenzaadje al een klein embryootje: de hele plant zit er al in aanleg in. Zaden van veel plantensoorten kun je onder optimale condities jarenlang bewaren zonder dat ze veel van hun kiemkracht verliezen. Beroemd is het verhaal van tarwe dat in de Egyptische koningsgraven in de piramides is aangetroffen. Het zou vanwege de optimale bewaarcondities 3.500 jaar lang zijn kiemkracht hebben behouden. Waarschijnlijk is dit toch een 'broodje aap'. De moderne genenbanken bewij-

zen dat je, ondanks de optimale condities, zaden regelmatig moet vervangen door nieuwe, omdat de kiemkracht afneemt. Een deel van de bewaarde zaden wordt dan uitgezaaid en van de hieruit kiemende planten worden weer nieuwe, verse zaden gewonnen voor hernieuwde opslag. Afhankelijk van de soort gebeurt dit na hooguit enkele tientallen jaren. In die tijd heeft het zaad maximaal 20% van zijn kiemkracht verloren. De houdbaarheid van de zaden kan worden verbeterd door ze te drogen tot een optimaal restvochtgehalte en door ze gekoeld te bewaren. Er zijn ook veel zaden die niet houdbaar zijn omdat ze niet kunnen worden gedroogd of gekoeld. Dat zijn de zogenoemde recalcitrante zaden.

Dierenzaad in kokende stikstof

Waar plantenzaden in een bescheiden koelte van -18 °C worden bewaard, wordt genetisch materiaal van dieren opgeslagen bij -196 °C. In die toestand is het materiaal waarschijnlijk 'oneindig', of op zijn minst duizenden jaren houdbaar. Dat is een groot voordeel ten opzichte van de genenbanken voor planten. Plantenzaden moeten regelmatig worden vernieuwd. Het zou overigens ook wel mogelijk zijn om dergelijke cryogene (diepvries) mogelijkheden voor plantenmateriaal toe te pas-

Genenbanken

Een genenbank is een instelling waar genetisch materiaal van planten of dieren wordt opgeslagen, bijvoorbeeld zaden, sperma, eicellen, embryo's, enzovoort. In verschillende landen zijn genenbanken aangelegd voor belangrijke landbouwgewassen, landbouwhuisdieren, maar ook voor schimmelcultures, bacteriën of virussen, en ook natuurlijke flora en fauna.

In Nederland heeft het Centrum voor Genetische Bronnen, Nederland (CGN) van Wageningen UR genenbanken voor land- en tuinbouwgewassen, bomen en voor landbouwhuisdieren. In 2008 is een heel grote internationale genenbank voor plantenzaden geopend die is gebouwd op een wel heel bijzondere locatie. De Svalbard Global Seed Vault is ge-

bouwd binnenin een zandsteenbergt op Spitsbergen. Die locatie is gekozen vanwege de afwezigheid van aardplaatbewegingen (geen aardbevingen), zijn ligging ver boven zeeniveau (geen risico bij stijging van de zeespiegel), beschutting voor nucleair en ander oorlogsgeweld, en vanwege de aanwezigheid van een permanent bevroren bodem: de per-

mafrost. Hierdoor zijn de kosten voor koeling laag en zijn de gevolgen van het eventueel uitvallen van de koelinstallatie zeer gering. De zaden worden bij een optimaal, laag vochtgehalte en bij een temperatuur van -18 °C bewaard. Er zijn nu al bijna 200 miljoen zaden van een half miljoen unieke monsters opgeslagen. Ze vertegenwoordigen eenderde van de

variëteiten aan voedselgewassen die op de wereld voorkomen. De genenbank heeft een capaciteit voor 4,5 miljoen zaadmonsters. Eigenlijk is Svalbard een grote 'back-up' voor diverse nationale genenbanken. Van de huidige zaadmonsters komt 4% (18.000 monsters) uit het Nederlandse Centrum voor Genetische Bronnen (CGN) in Wageningen.

Van het graan teff wordt beweerd dat het zijn kiemkracht gedurende duizenden jaren in de Egyptische pyramides heeft behouden.

sen. Wortel- of scheuttopjes, maar ook sommige zaden, zouden in diepgevroren toestand kunnen worden opgeslagen. In de praktijk gebeurt dat veel minder, voornamelijk vanwege de kosten.

Genenbanken voor dieren bevatten veelal zaadcellen van de mannelijk dieren. Ook eicellen, embryo's en ander genetisch materiaal kan worden opgeslagen om later nakomelingen mee te creëren. Ook heel andere celtypen, bijvoorbeeld bloed of stamcellen voor geneeskundige toepassingen, kunnen met vergelijkbare cryogene technieken worden ingevroren en in diepgevroren toestand worden bewaard.

Het diepgevroren materiaal wordt bewaard in tanks met vloeibare stikstof. De stikstof bevindt zich op zijn kookpunt van -196 °C. De tanks zijn heel goed geïsoleerd waardoor maar langzaam warmte binnendringt. De warmte die binnendringt wordt door de stikstof 'verbruikt' voor het koken. Langzaam vervliegt dus wat stikstof, waardoor regelmatig moet worden bijgevuld.

Stilstand is geen achteruitgang

Voor het opslaan van materiaal in de genenbank is het heel belangrijk dat je weet, of zelfs kunt voorspellen, hoe lang het materiaal zijn vitaliteit behoudt. Genetisch materiaal kan zeker worden beschadigd of doodgaan tijdens het proces van invriezen of ontdooien. Afgezien daarvan nemen we aan dat tijdens de opslag van het materiaal in vloeibare stikstof het materiaal niet in kwaliteit achteruit gaat. Die aanname is gebaseerd op het theoretische principe dat de diffusie van moleculen en ionen bij de temperatuur van vloeibare stikstof volledig stilligt. Hierdoor vinden er geen chemische reacties of fysische overgangen meer plaats. Je kunt zeggen dat de tijd als het ware is stilgezet.

Toch zijn er veel mensen die vrezen of zelfs rapporteren dat biologisch materiaal tijdens opslag in vloeibare stikstof achteruitgaat. Die problemen komen mogelijk voort uit het slordig bijvullen van de stikstoftanks. Ook zijn er systemen waar-



bij het materiaal in de koude damp van vloeibare stikstof wordt opgeslagen in plaats van in de vloeibare stikstof zelf. In die gevallen bestaat het risico van tijdelijke opwarming van het materiaal wanneer de tank even wordt geopend om materiaal erin te zetten of te verwijderen. Het staat vast dat ingevroren materiaal kan worden beschadigd bij temperaturen hoger dan die van vloeibare stikstof, zelfs al is die temperatuur nog veel lager dan het vriespunt.

In de praktijk hebben we gegevens over genetisch materiaal van enkele decennia oud. Het oudste menselijke sperma waarvan gerapporteerd is dat het met succes voor *in vitro* bevruchting (IVF) werd gebruikt was 29 jaar opgeslagen. Bij rundvee is IVF met succes toegepast met sperma dat 37 jaar lang in de stikstof had gezeten. In 2004 werd in Nederland een kalf geboren na kunstmatige inseminatie van een koe met 26 jaar oud sperma uit de CGN genenbank.

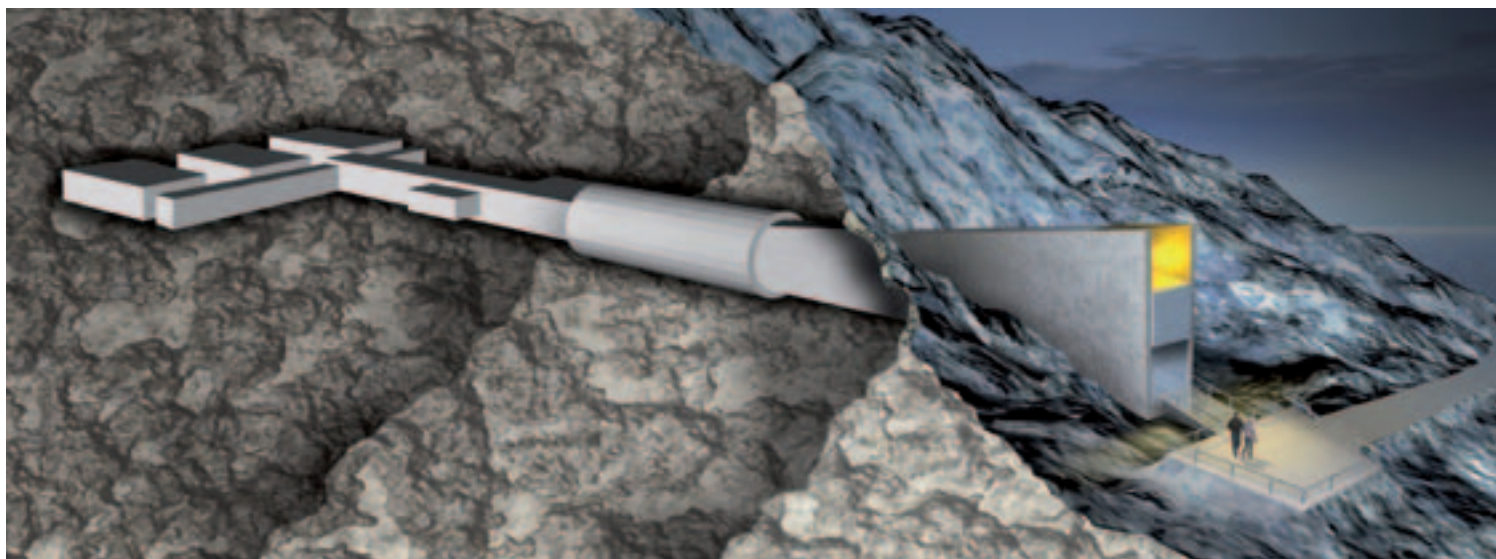
Genenbanken niet alleen voor de lange termijn

Dat je in de stikstof van een genenbank genetisch materiaal 'oneindig lang' kunt opslaan, betekent

dat je de huidige, nog resterende genetische diversiteit voor de eeuwigheid zou kunnen redden. Rassen of foklijnen die verloren raken kunnen indien gewenst worden teruggefokt. Opgeslagen materiaal kan ook worden gebruikt als er genetische gebreken door inteelt aan de dag treden. Ook kan opgeslagen materiaal van een ras of van verschillende rassen en foklijnen worden gebruikt voor ontwikkeling van een nieuw ras of foklijn, bijvoorbeeld door inkruising van specifieke eigenschappen uit andere, bijvoorbeeld exotische rassen.

Ook op de korte termijn kan genetisch materiaal uit de genenbank de fokkerij van kleine populaties helpen. Het behoud en levend gebruik van zeldzame rassen, de zogenaemde *in situ* conservering, wordt hiermee ondersteund. De inzet van diepvriessperma en -embryo's, afkomstig van dieren uit eerdere generaties, kan een verrijking van het genetische aanbod betekenen voor kleine populaties. Hierdoor kun je inteelt en verlies van genetische eigenschappen beperken. In dat geval zal de collectie dus actief worden gebruikt en is ook regelmatig aanvulling en vernieuwing nodig.

Diep in een rots op Spitsbergen wordt het zaad van zoveel mogelijk landbouwgewassen bewaard.



VRAAG 1

In een genenbank voor plantenmateriaal, moet je het materiaal regelmatig 'verversen'. Waarom hoef je daar geen nieuwe plantenzaden voor te verzamelen?

Het diepvriesassortiment

Sperma

Diepvriessperma wordt heel veel gebruikt. Bij de meeste landbouwhuisdiersoorten is de winning en het invriezen van sperma goed mogelijk, zoals bij rund, schaap, geit, varken, paard en kip. Voor verschillende diersoorten, met name voor rund en varken, bestaan ook organisaties die de winning of het gebruik van het sperma regelen. Diepvriessperma is ideaal voor ondersteuning van de fokkerij van kleine rassen. Een nadeel van sperma is dat een zaadcel maar de helft van de chromosomen bevat. Als een ras verloren is gegaan, dan moet het worden teruggefokt via moeders van een ander, nog bestaand ras. Om het verloren ras weer enigszins zuiver terug te krijgen is dan een serie van ten minste 6 generaties 'terugkruisingen' nodig. Dit kost veel zaad en tijd.

Diepvrieseitjes en -embryo's

Als je embryo's opslaat, of op zijn minst eicellen plus sperma, dan kun je een verloren ras in één generatie op de kaart terugzetten. Het invriezen van embryo's is een routineprocedure geworden bij het rund. Veel van de technieken die momenteel worden gebruikt voor het invriezen van mensensperma's werden oorspronkelijk ontwikkeld voor het rund.

Het invriezen van embryo's van schapen gaat ook relatief goed. Embryo's van het varken bleken veel minder gemakkelijk in te

vriezen. Toch is het uiteindelijk gelukt om levende biggen te krijgen van diepvriesembryo's. Ook van paard en geit worden succesvol embryo's ingevroren. Methoden voor het invriezen van eicellen zijn over het algemeen pas kort geleden ontwikkeld. De resultaten zijn soms verrassend goed! Er zijn al

heel veel mensenbaby's geboren uit embryo's die werden verkregen door bevruchting van diepvrieseicellen. Ook voor rund en paard zijn levend geboren jongen uit diepvrieseicellen gemeld.

Eierstokweefsel

In plaats van eicellen kun je ook het weefsel waar die eicellen uit komen, de eierstokken of ovaria opslaan. Dit wordt bijvoorbeeld gedaan voor vrouwen die door kanker hun vruchtbaarheid verliezen. Het ingevroren eierstokweefsel kan later eventueel weer gebruikt worden om eicellen te winnen. Recent is een methode ontwikkeld om bij muizen ovaria in te vriezen. Deze techniek kan worden gebruikt om op een heel efficiënte manier de vele tienduizenden genetisch gemanipuleerde muizenstammen te bewaren die voor proefdieronderzoek zijn gemaakt.

Klonen met gewone cellen uit de diepvries

Ook uit gewone lichaamscellen kun je nageslacht creëren. Dat gaat via klonering. Het schaap Dolly had in 1997 de primeur. Het was het eerste uit een volwassen lichaamscel gekloonde dier. Na het schaap Dolly volgden nog veel diersoorten. Klonen gebeurt door de kern van een gewone lichaamscel in een eicel te plaatsen waarvan eerst de eigen kern is verwijderd.

Het winnen van geschikte cellen is een makkelijke. Bijvoorbeeld een stukje oorweefsel kan worden verkregen tijdens het (meestal verplichte) oormerken van een dier. Ook de methoden voor het invriezen van dergelijke cellen zijn relatief eenvoudig. Het aanleggen van een collectie zogenoemde somatische cellen is daarom relatief goedkoop. Maar als het materiaal ooit gebruikt moet worden voor klonering, dan zijn de methoden om uit de cellen een levend dier te creëren ingewikkeld en kostbaar. Bovendien blijkt dat de efficiëntie van deze methoden voor sommige diersoorten vrij laag ligt. Meestal ontwikkelt minder

Met behulp van diepvrieszaad
kun je inteelt voorkomen



Het eerste gekloonde schaap ter wereld, Dolly, staat nu in het Royal Museum of Scotland, Edinburgh.

dan 5% van de gecreëerde embryo's zich normaal. Er komen vrij veel spontane abortussen voor en er worden ook wel misvormde jongen geboren. Je mag verwachten dat onze inzichten in het klonen in de komende decennia verbeteren, zodat de nu opgeslagen lichaamscellen ooit veilig en efficiënt kunnen worden gebruikt voor het verkrijgen van gezonde dieren. Op die manier kan het opslaan van gewone cellen een goedkope manier zijn om genetische diversiteit te bewaren als de mogelijkheden of financiën voor andere manieren ontoereikend zijn.

De biologie van de diepvries

Levende cellen verbruiken zuurstof en voedingsstoffen, en scheiden afvalstoffen uit. Om te voorkomen dat een langhoudbare cel verhongert of zichzelf vervuult, zou je deze levensprocessen moe-

ten stilleggen of op zijn minst heel sterk moeten vertragen. Er zijn in de natuur voorbeelden waarin dit kennelijk kan, bijvoorbeeld in schimmelsporen, plantenzaden en ingekapselde eitjes. Eieren van watervlooien, bijvoorbeeld, kunnen decennia overleven in sedimentlagen. Er zijn ook dieren die jaren van uitdroging kunnen overleven. De zogenaamde mosbeertjes of *tardigrada* (een aparte stam aan de stamboom van de dieren) kunnen ten minste 10 jaar in volledig uitgedroogde toestand overleven. Hierbij wordt hun snelheid van stofwisseling met ten minste een factor 10.000 verlaagd (anabiose of cryptobiose). De mosbeertjes bereiken deze toestand van cryptobiose door uitdroging, waarbij het vochtgehalte terugloopt tot 1% van de normale waarde. Bovendien produceren de mosbeertjes vóór ze uitdrogen heel hoge concentraties van een specifieke suiker: trehalose in hun cellen. De hydroxylgroepen van de suikermoleculen vervangen als het ware die van de watermoleculen, doordat ze op vergelijkbare wijze waterstofbruggen kunnen vormen met de celmembranen en met eiwitten, waardoor die gestabiliseerd worden. In deze toestand kunnen de diertjes extreme condities overleven, zoals temperaturen tot bijna het absolute nulpunt, hitte tot 151 °C, overdruk tot 1200 bar of juist vacuüm, en radioactieve straling.

Invriezen is een manier om alle processen, dus ook levensprocessen, te vertragen of stil te leggen. Toch is het invriezen van levende cellen moeilijker dan het lijkt. Dit komt omdat die cellen veel water bevatten, waardoor ijskristallen ontstaan. Om verschillende redenen is vorming van ijs binnen cellen dodelijk. Dat het invriezen van levende cellen toch kan, heeft eigenlijk ook met uitdroging te maken. Het blijkt dat de onderliggende processen van invriezen en drogen veel parallellen hebben.

Levend bevroren in de vrije natuur

In het hooggebergte of op de polen moeten levende wezens vaak perioden overbruggen van extreme

koude. Veel dieren in dergelijke gebieden hebben een strategie ontwikkeld om dit te overleven. Een in het oog springend voorbeeld is de Noord-Amerikaanse boskikker. Net als enkele andere kikkersoorten is hij in staat om te bevriezen tot een steenharde klomp, om vervolgens in warmere tijden te ontdooien en verder te leven. In de bevroren toestand is er geen hartslag en geen hersenactiviteit. Het dier heeft kennelijk een truc om wel te bevriezen maar hierdoor niet beschadigd te raken. Binnen de huid van het dier gebeurt iets opmerkelijks. Het dier is in staat om het water uit zijn organen af te voeren naar de ruimte tussen de organen en de huid. En dat water bevriest daar tot een harde klomp ijs. Bovendien produceren de dieren glycerol. De 'waterconcentratie' in de weefsels wordt minder, enerzijds door het afvoeren van water naar de buikholte en anderzijds door de hoge concentratie glycerol. Hierdoor wordt voorkomen dat in de cellen ijsvorming optreedt. De kikkers kunnen zo een temperatuur van $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$

VRAAG 2

Wat zijn cryonisten?

overleven. Daalt de temperatuur nog verder, dan sterft zelfs deze kikker.

Veel dieren kunnen nog lagere temperaturen overleven, spinnen en insecten bijvoorbeeld. Het zijn vaak de eieren, of de larven die koudetolerant zijn. De truc is vaak hetzelfde. Het aanmaken van stoffen die 'water vervangen' zoals glycerol en trehalose, en het verder verlagen van het watergehalte door uitdroging. Een keverlarve uit Alaska heeft onlangs het record gevestigd. De koudste temperatuur die ooit gemeten is in het leefgebied van de kever is $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$. Om te kijken of de larven nog extremere koude overleven, werden de larven in een experiment in het laboratorium blootgesteld aan een temperatuur van $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Een deel van de larven overleefde dit. In dit geval moet het watergehalte in de cellen zo extreem zijn verlaagd dat zelfs bij zo'n lage temperatuur geen ijsvorming kan optreden. Het cytoplasma van de cellen gaat over in de zogenoemde glastoestand, waarbij de stofwisseling volledig stilligt. Het over-

Mosbeertjes in space

In september 2007 is tijdens een ESA ruimtemissie een aantal gedroogde mosbeertjes gedurende 10 dagen aan het vacuüm, de kosmische straling en de intense UV-straling van de ruimte blootgesteld. Na opnieuw toevoegen van water (rehydratie) bleken de diertjes hun ruimte-

avontuur te hebben overleefd! Alleen de UV-straling (duizendmaal sterker dan op aarde) bleek cellen en het daarin aanwezige DNA bij veel diertjes te hebben beschadigd maar een aantal van hen overleefde zelfs de combinatie van de drie aanslagen op hun gestel.



Mosdierpjes kunnen tien jaar in volledig uitgedroogde toestand overleven.



Amerikaanse boskikkers
verdragen temperaturen tot
-8 °C.

gaan in de glastoestand noemt men vitrificatie: het lijkt bevroren, of op zijn minst hard, maar fysisch gesproken is het nog steeds vloeibaar.

Antivries bij toeval ontdekt

De meeste organismen zijn niet vriestolerant, sterker nog: vaak zelfs niet eens koudetolerant. De eerste pogingen om organismen of cellen in te vriezen waren dan ook niet succesvol. In 1948 probeerden onderzoekers van het Engelse *National Institute for Medical Research* de 'truc' om ijsvorming in de cellen te voorkomen door water uit de cellen weg te trekken. Ze deden dat door een invriesmedium met een hoge concentratie fructose te gebruiken.

Ijsvorming binnenin een cel is dodelijk

Eerst lukte dit niet, maar in een nieuw experiment, na een verhuizing van het lab, was het opeens bijzonder succesvol! Het bleek dat men per ongeluk een verkeerde fles had genomen. Deze bevatte in plaats van de suikeroplossing een oplossing van het eiwit albumine en de stof glycerol. Op deze manier is de beschermende werking van glycerol ontdekt en werd een methode gevonden om zaadcellen met succes in te vriezen.

Invriezen doe je héél voorzichtig

Om te begrijpen hoe glycerol en vergelijkbare 'cryobeschermende' stoffen werken, moet je eerst kijken wat er gebeurt tijdens het invriesproces. Ijsvorming in cellen is dodelijk, zoveel is duidelijk. Maar net onder het vriespunt is de kans maar heel klein dat ijsvorming begint in een cel. De kans is veel groter dat dit begint in het veel grotere volume vloeistof buiten de cellen. Zodra daar een ijskristal is ontstaan, groeit dit snel aan. Ijs bevat vrijwel uitsluitend watermoleculen. De in het medium opgeloste stoffen en de cellen blijven achter in de nog niet bevroren vloeistof tussen de groeiende ijsmassa's. Naarmate de ijsmassa groeit en de nog vloeibare fractie kleiner wordt neemt hierin de concentratie opgeloste stof toe. De 'waterconcentratie' neemt dus juist af. Door osmose wordt dan ook steeds meer water onttrokken aan de cellen. De afname van de waterconcentratie leidt ertoe dat het vriespunt van de nog niet bevroren vloeistof en van de vloeistof in de cellen even snel daalt als de temperatuur. Met andere woorden, de neiging voor water in de cellen om ijs te vormen is steeds vrijwel nul. Voorwaarde is wel dat het afkoelen langzaam genoeg verloopt, zodat de cellen voldoende tijd krijgen om water af te geven aan de ruimte buiten de cellen. Als de cellen gaan 'achterlopen', bevroren ze wel. 'Slow freeze' wordt deze techniek dan ook genoemd.

De werking van glycerol is nu te begrijpen: het is een stof die door de celmembraan kan passeren. Terwijl een deel van het water via osmose uit de cellen wordt 'getrokken' gaat glycerol de cel in. Glycerol gaat bijna even snel naar binnen als het water eruit stroomt. Hierdoor zullen de cellen vóór het invriezen heel tijdelijk en maar heel weinig krimpen. Tijdens het invriezen krimpen de cellen wel doordat de ijsvorming water onttrekt. Maar omdat zowel in het medium als in het cytoplasma het water voor een deel is vervangen door glycerol, wordt er veel minder ijs gevormd en hoeven de cel-

VRAAG 3

Leeft genetisch materiaal in vloeibare stikstof eigenlijk nog?

len veel minder water af te voeren. Hierdoor hebben de cellen meer ruimte in de resterende 'niet bevroren fractie' tussen de ijsmassa's, en hoeven de cellen veel minder extreem te krimpen en te verschrompelen tijdens het invriezen.

Suikers en zouten kunnen de celmembranen niet passeren. Als je zou proberen om water uit de cellen te trekken met een suikeroplossing, zoals de Engelse onderzoekers eerst probeerden, dan zullen de cellen al direct heel sterk krimpen. Al voor het invriesproces begint, raken ze hierdoor beschadigd, terwijl ze vervolgens tijdens het invriesproces nog weer verder zullen krimpen, en wel even ver als zonder de verhoogde suikeroplossing. Hiermee is dus niets gewonnen. Nadat de werking van glycerol was ontdekt, zijn tal van vriesbeschermende stoffen (cryoprotectantia) gevonden met een vergelijkbare werking.

Glasvorming in de natuur

De kikker die vrieskou van $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ overleeft, vormt kristallijn ijs in de ruimte buiten de weefsels. Bij verdere afkoeling zou er ijs in de cellen ontstaan omdat het weefsel nog te veel water bevat. De

levensprocessen in de weefsels gaan dan ook door, op een heel laag peil, ook al staat het hart stil. De kever die een temperatuur van $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ overleeft, vormt echter geen ijskristallen. Het dier verlaagt het watergehalte van de weefsels zo sterk dat ijsvorming niet optreedt en er bij afkoeling vitrificatie optreedt. De kever doet dit door, vóór het extreem koud wordt, een heel hoge concentratie glycerol in de weefsels te produceren en verder nog water af te voeren door verdamping.

Bij 'slow freeze'-methoden gebruikt men een concentratie van enkele procenten, tot 15%, glycerol of een andere cryoprotectans. Zoals hierboven uitgelegd onttrekt de vorming van ijs heel veel water aan de resterende oplossing, waardoor de oplossing indikt en de concentraties van het cryoprotectans en de andere opgeloste stoffen ook extreem toenemen, totdat glasvorming kan optreden.

Onderzoekers bedachten dat voorzichtig invriezen niet nodig zou zijn als je de cellen al direct, voor het koelen, in een oplossing zou brengen met een heel hoge concentratie cryoprotectantia. Normaal zijn deze stoffen bij dergelijke hoge concentraties toxisch. Maar door combinaties

Wat er gebeurt tijdens langzaam invriezen van cellen

Als we cellen in een waterige oplossing langzaam invriezen worden ze ingesloten door ijsmassa's maar blijven omringd door een kleine fractie niet bevroren vloeistof. Ook in de cellen treedt geen ijsvorming op mits het koelen langzaam gaat zodat

de cellen hun water aan de omgeving kunnen afvoeren. In de aanwezigheid van glycerol en bij een voldoende langzaam tempo van afkoelen, hebben de cellen dus een redelijke kans om zich nog enigszins *happy* te voelen tijdens het

invriezen. Als de afkoeling steeds verder gaat, wordt na verloop van tijd een punt bereikt waarbij de nog vloeibare fractie en het cytoplasma van de cellen hard worden en over gaan in de zogenaamde glastoestand. Dit is een toestand waarin de materie niet

kristallijn (lees: schadelijk) is, zoals ijs, maar wel vast. De 'viscositeit' van de 'vloeistof' is zo hoog geworden dat diffusie van moleculen op normale tijdschaal niet meer plaats vindt. Hierdoor vinden ook chemische reacties en dus ook levensprocessen

en fysische transitie niet meer plaats. De glastoestand is daarom bijzonder stabiel. Het materiaal kan nu veilig worden overgebracht in vloeibare stikstof, en bij de temperatuur van $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ worden opgeslagen en eventueel getransporteerd.



Bij het bedrijf Alcor Life Extension laten mensen zich voor veel geld na hun dood invriezen. Alleen je hoofd invriezen is iets goedkoper dan je hele lichaam.

van stoffen te gebruiken, en door de blootstelling aan de allerhoogste concentratie kort te houden, kon toch een uitstekende overleving van muizen-embryo's worden verkregen. Later werden vergelijkbare methoden ontwikkeld voor embryo's van andere diersoorten, inclusief de mens, en voor eicellen en kleinere stukjes weefsel. Door de afkoelsnelheid extreem hoog te maken kon de concentratie cryoprotectans worden verlaagd. Door deze zogenoemde metastabiele vitrificatie werd de afgelopen jaren een doorbraak bereikt in invriesmethoden voor eicellen.

Eeuwig leven is onbetaalbaar

In Amerika zijn er nu al mensen die hun lichaam na hun dood laten invriezen in de hoop dat de wetenschap van de toekomst niet alleen hun doodsoorzaak kan wegnemen maar tevens de invriesschade kan repareren. Interesse? De tarieven staan op www.americancryonics.org. Met de huidige stand van de invriestechniek is echter zeker dat in vrijwel alle weefsel van alle organen

het merendeel van de cellen door ijsvorming onherstelbaar beschadigd zal zijn.

Wat wél realistisch en zinvol is, is om te proberen organen in te vriezen middels vitrificatie. De weefsels worden dan eerst verzadigd met een vitrificatieoplossing die via de bloedvaten door het orgaan worden gepompt. Met kleinere organen, zoals de nieren van een konijn, werden redelijke successen geboekt. In een enkel geval kon een konijn gedurende langere tijd overleven na transplantatie van gevitrificeerde nieren. Bij grotere organen wordt dit vele malen moeilijker. De voortgang in dergelijk onderzoek is maar gering. Probleem is dat de vitrificatieoplossing giftig is. Toch moet deze toxische oplossing het hele orgaan bereiken, en hiervoor is tijd nodig. Bovendien bestaat een ingewikkeld orgaan uit verschillende structuren, weefsels en celtypen, die verschillend reageren in het vitrificatieproces. Als we er in slagen om organen in te vriezen is dit van groot belang voor het aanleggen van donorbanken voor transplantatiedoeleinden.